

Influência da cultivar, da época de colheita e do tamanho do fruto na pungência de pimentos ‘Padrón’

João Nuno Orvalho Marques da Silva

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientadores: Doutor António José Saraiva de Almeida Monteiro

Doutor António Eduardo Baptista Leitão

Júri:

Presidente: - Doutora Cristina Maria Moniz Simões Oliveira, Professora Associada com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: - Doutor António José Saraiva de Almeida Monteiro, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;
- Doutora Maria Helena Guimarães de Almeida, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Agradecimentos

Ao Professor António Monteiro, pela valiosa orientação, pelos ensinamentos e correções, pela disponibilidade e constante preocupação, e acima de tudo pela paciência ao longo de todo este trabalho.

Ao Dr. António Eduardo Leitão, pela orientação, pela amizade, pelo conhecimento transmitido, pela disponibilidade e atenção demonstrada.

À Professora Mariana Mota, pelas recomendações.

Aos Viveiros da Silveira, pela cedência das plantas.

Ao meu avô Alfredo Orvalho, pela forte amizade, pelos conselhos, pela cooperação, pelo apoio e incentivo, e por acompanhar cada passo,

À minha mãe Rosário Orvalho, pelo amor e carinho, pela preocupação, pela compreensão e pelo apoio incondicional.

À minha tia Cristina Orvalho, primos Leonor e Diogo e irmão Pedro, pela ajuda imprescindível do terreno, pela amizade e por todo o apoio e motivação.

À Eng. Susana Covão, pelo apoio técnico no controlo de pragas e doenças do ensaio.

Aos meus amigos António Freitas da Silva e José Maria Oliveira, pelo apoio, disponibilidade e força.

Aos meus amigos Miguel Coelho e José Nunes, pela força, preocupação e indispensável ajuda.

Aos meus amigos José Vilaça e José Umbelino, pelos sábios conselhos.

Aos meus restantes familiares, amigos e colegas pela força e motivação.

Resumo

Os pimentos Padrón são bem conhecidos por apresentarem grande variabilidade de forma e tamanho do fruto, e de intensidade da pungência. Todavia este elevado padrão de variabilidade tem-se vindo a alterar nos últimos anos devido à crescente utilização de cultivares com menor variabilidade genética interna. O objetivo do presente trabalho foi conhecer os fatores que determinam a pungência dos pimentos Padrón e caracterizar a sua variação em função da época de colheita e da cultivar.

Foi realizado um ensaio de campo, na Chamusca, no período maio-setembro de 2016, comparando 4 cultivares de pimento. Os frutos foram colhidos ao longo do verão, tendo sido determinado por HPLC, o seu teor nos dois capsaicinoides mais importantes, a capsaicina (CAP) e a dihidrocapsaicina (DH). Com base nos teores dos frutos em CAP e DH, foi determinado o índice SHU (*Scoville Heat Units*), que exprime a intensidade da pungência dos frutos. O valor de SHU variou com a cultivar, comprovando que as 4 cultivares testadas apresentaram diferentes intensidades de pungência.

Em todas as cultivares, durante o período de colheita, o valor de SHU aumentou desde 5 de julho até 22 de agosto e diminuiu em setembro, variando entre 113,03 e 23 938,89 SHU. Os teores de capsaicinoides acompanharam a evolução da temperatura. Não existiu correlação entre o tamanho do fruto e a intensidade da pungência, mas houve variação no valor de SHU entre plantas de cultivares com elevada variabilidade genética interna. Estas cultivares apresentaram elevada variabilidade interna no grau de pungência, tamanho e forma dos frutos, ao contrário das outras cultivares. Como o grau de pungência variou ao longo da época de colheita, as cultivares com baixa variabilidade interna poderão apresentar frutos uniformemente quase doces no início da colheita, bastante picantes no pico da colheita e com menor pungência no final.

Palavras-chave: *Capsicum annuum* L.; Padrón; Pungência; Capsaicinoides; HPLC.

Abstract

Padrón peppers are well known for their great variability of fruit shape and size, and intensity of pungency. However, this high standard of variability has been changing in recent years due to the growing use of cultivars with lower internal genetic variability. The objective of this work was to know the factors that determine the pungency of the Padrón peppers and to characterize their variation as a function of the harvest season and the cultivar.

A field trial was carried out at Chamusca, in the period May-September of 2016, comparing 4 pepper cultivars. The fruits were harvested over the summer, and their content in the two most important capsaicinoids, capsaicin (CAP) and dihydrocapsaicin (DH), were determined by HPLC. Based on the fruit contents in CAP and DH, the SHU (Scoville Heat Units) index was determined, which expresses the intensity of the fruit pungency. The value of SHU varied with the cultivar, proving that the four cultivars tested had different intensities of pungency.

In all cultivars, during the harvest period, the value of SHU increased from the 5th of July until the 22nd of August and decreased in September, the values varied between 113,03 and 23 938,89 SHU. The capsaicinoids contents varied with the temperature. There was no correlation between the size of the fruit and the intensity of the pungency, but there was variation in the value of SHU between plants of cultivars with high internal genetic variability. These cultivars showed high internal variability in the degree of pungence, size and shape of the fruits, unlike the other cultivars. As the degree of pungency varied throughout the harvest period, the cultivars with low internal variability could show fruits that were uniformly almost sweet at the beginning of the harvest, quite spicy at the peak of the harvest and with lower pungency at the end.

Key words: *Capsicum annuum* L.; Padrón; Pungency; Capsaicinoids; HPLC.

Índice

Índice	i
Índice de figuras	iii
Índice de quadros	v
Lista de abreviaturas	vi
1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica	4
2.1. Origem e dispersão do pimento Padrón	4
2.2. Descrição da variedade do pimento Padrón	5
2.3. A cultura do pimento Padrón	7
2.5. Capsaicinoides e pungência.....	8
2.5.1. Capsaicinoides	9
2.5.1.1. Capsaicina	10
2.5.1.2. Dihidrocapsaicina	11
2.5.2. Determinação da pungência.....	12
2.5.2.1. Teste de Scoville	12
2.5.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	13
3. Material e métodos	15
3.1. Descrição do ensaio	15
3.2. Amostragem	17
3.3. Preparação das amostras	18
3.4. Extração dos capsaicinoides	19
3.5. Análise por HPLC	20
3.6. Tratamento de dados	21
4. Resultados e discussão.....	23

4.1. Identificação dos capsaicinoides	23
4.2. Influência da época de colheita e da cultivar.....	25
4.3. Correlação entre o tamanho do fruto e a pungência	31
5. Conclusões.....	36
Referências bibliográficas	38
Anexo 1 - Influência da época de colheita e da cultivar	42
Anexo 2 - Correlação entre o tamanho do fruto e a pungência	45

Índice de figuras

Figura 1 - Logótipo oficial da DOP “Pemento de Herbón” (Consejo Regulador de la DOP “Pemento de Herbón”, 2010).	5
Figura 2 - Plantas de pimento Padrón em floração.	6
Figura 3 - Estrutura molecular da capsaicina (Othman <i>et al.</i> , 2011).	11
Figura 4 - Estrutura molecular da dihidrocapsaicina (Othman <i>et al.</i> , 2011).	11
Figura 5 - Esquema da plantação do ensaio.	16
Figura 6 - Parcela com estufa no dia da última colheita.	17
Figura 7 - Extratos em acetonitrilo (esquerda). Banho-maria de agitação P. Selecta Unitronic OR (direita).	19
Figura 8 - HPLC <i>Beckman System Gold Chromatograph 126 Solvent Module</i> e injetor automático Spark Holland MIDAS utilizados.	20
Figura 9 - Cromatograma da solução-mãe de capsaicina.	23
Figura 10 - Cromatograma da solução-mãe de dihidrocapsaicina.	23
Figura 11 - Exemplo de cromatogramas das soluções padrão: diluição 3 (esquerda) e diluição 7 (direita).	24
Figura 12 - Curva de calibração da capsaicina.	24
Figura 13 - Curva de calibração da dihidrocapsaicina.	25
Figura 14 - Exemplo de cromatogramas de amostras: 3ª repetição da amostra 16 (esquerda) e 1ª repetição da amostra 103 (direita).	25
Figura 15 - Gráfico do valor médio da pungência por data de colheita.	26
Figura 16 - Gráfico do valor médio da pungência por cultivar.	27
Figura 17 - Gráfico do valor médio dos teores de capsaicinoides por data de colheita.	27
Figura 18 - Gráfico do valor médio dos teores de capsaicinoides por cultivar.	28
Figura 19 - Variação da temperatura ao longo do tempo. Temperaturas médias diárias dos 21 dias antes de cada colheita e concentrações de CAP e DH.	29

Figura 20 - Variação das temperaturas diurna e noturna ao longo do tempo. Temperaturas médias diurnas e noturnas dos 21 dias antes de cada colheita e concentrações de CAP e DH.	30
Figura 21 - Variação da radiação solar ao longo do tempo. Radiação média dos 21 dias antes de cada colheita e concentrações de CAP e DH.....	31
Figura 22 - Correlação entre os valores da pungência e massa das amostras da cultivar P ₁ ...	32
Figura 23 - Correlação entre os teores de capsaicinoides e massa das amostras da cultivar P ₁	32
Figura 24 - Relação linear para os valores da pungência e massa das amostras da cultivar P ₂	34
Figura 25 - Relação linear para os teores de capsaicinoides e massa das amostras da cultivar P ₂	34

Índice de quadros

Quadro 1 - Classificação botânica do pimento (Almeida, 2006).	5
Quadro 2 - Exportação de nutrientes pela cultura do pimento (Almeida, 2006).	8
Quadro 3 - Escala de Scoville (Alves, 2015).	12
Quadro 4 - Variação dos teores de capsaicinoides e da pungência ao longo da época de colheita e entre cultivares (n = número de amostras).	26
Quadro 5 - Tabela resumo dos testes de Fisher e <i>p-value</i> das ANOVA's. Todos os valores de F superior aos valores de F tabelados (F=3,182 quando df=3; F=2,776 quando df=4; F=2,179 quando df=12) e de <i>p-value</i> inferior a 0,05 foram sombreados a verde....	28
Quadro 6 - Tabela resumo dos <i>p-value</i> das ANOVA's da cultivar P1. Todos os valores de F superior aos valores de F tabelados (F=12,706 quando df=1; F=2,074 quando df=22) e de <i>p-value</i> inferior a 0,05 foram sombreados a verde.	33
Quadro 7 - Tabela resumo dos <i>p-value</i> das ANOVA's da cultivar P ₂ . Todos os valores de F superior aos valores de F tabelados (F=12,706 quando df=1; F=2,074 quando df=22) e de <i>p-value</i> inferior a 0,05 foram sombreados a verde.	35
Quadro 8 - Médias das três injeções da análise por HPLC das amostras do primeiro estudo. .	42
Quadro 9 - Médias das três injeções da análise por HPLC das amostras do segundo estudo.	45

Lista de abreviaturas

ANOVA - Análise de variância

CAP - Capsaicina

DH - Dihidrocapsaicina

DOP - Denominação de Origem Protegida

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ISA - Instituto Superior de Agronomia

P₁ - Padrón 1

P₂ - Padrón 2

P_d - Padrón d

P_p - Padrón p

SHU - Scoville Heat Units

ULisboa - Universidade de Lisboa

1. Introdução

Os pimentos compreendem várias espécies do género *Capsicum* da família das Solanáceas. O pimento (*Capsicum annuum* L.) é uma planta hortícola de origem americana. Após a descoberta do continente americano, esta espécie foi espalhada por todo o mundo ao longo dos últimos 500 anos, devido ao interesse do consumo dos seus frutos, tanto em fresco como secos, moídos ou processados, dada a riqueza dos frutos em vitaminas e antioxidantes (Leira *et al.*, 2006). Segundo Nuez *et al.* (1996) e Santos (2009), o pimento é uma das dez culturas hortícolas com maior expressão a nível mundial tanto a nível de área como a nível de produção.

Alguns do interesse da cultura do pimento deve-se às características pungentes dos seus frutos que em muito têm vindo a interessar na alimentação humana, chegando a ser considerado como um substituto da pimenta. Os compostos responsáveis por essa pungência são os capsaicinoides, que estão presentes em todas as espécies do género *Capsicum*, sendo essa a razão do nome do género (Iwai *et al.*, 1979). Segundo Pita da Veiga (1993), dentro desse género, são cultivadas cinco espécies de três diferentes origens: do México (*Capsicum annuum* L.), da Amazónia (*Capsicum chinense* Jacq. e *Capsicum frutescens* L.) e do sul do Peru e da Bolívia (*Capsicum baccatum* L. e *Capsicum pubescens*).

O pimento Padrón é uma variedade da espécie *Capsicum annuum* L. que integra diversos pratos da cozinha tradicional espanhola, especialmente entradas, em que é servido frito ou grelhado. Têm vindo a ganhar muita fama em Espanha devido principalmente à aleatoriedade da pungência entre os frutos servidos no mesmo prato, sendo que daí surge uma frase bastante popular em Espanha: “*Los pimientos de Padrón, unos pican y otros no*”. Esta cultura tem vindo a desenvolver-se tanto que, desde 2010, já existe uma DOP para o pimento Padrón: “*Pimiento de Herbón*”, onde se tem vindo a produzir esta variedade com o intuito de comercialização (Consejo Regulador de la DOP “Pemento de Herbón”, 2010). Atualmente, esta cultura já tem também uma dimensão considerável noutros países próximos como Portugal e Marrocos (Sequeiro, 2006).

As cultivares de pimento Padrón usadas tradicionalmente apresentam alta variabilidade interna porque o pimento tem elevado grau de alogamia. Atualmente, têm vindo a ser substituídas por cultivares híbridas F1 que se conhecem como sendo mais estáveis em níveis de produção e na acumulação de compostos (como os capsaicinoides) nos frutos.

Os capsaicinoides são metabolitos secundários que surgem da condensação de um composto intermediário da via dos fenilpropanoides e um composto proveniente da via dos ácidos gordos (Díaz *et al.*, 2004). Os dois capsaicinoides principais, que normalmente são responsáveis por cerca de 80-90% da pungência, são a capsaicina e a dihidrocapsaicina.

Segundo Iwai (1979), o teor de capsaicinoides depende essencialmente de dois grupos de factores e das suas interações: os internos à planta e os externos relativo ao meio. Os factores internos dependem do genótipo. Os factores externos são a temperatura, a humidade do solo e da atmosfera, a luminosidade, a disponibilidade de nutrientes, etc. A interação entre os factores internos e os factores externos é o que mais influencia os teores de capsaicinoides, mas não se conhece completamente o comportamento dos vários genótipos em diferentes condições do meio.

Com a dimensão dos factores relativos ao meio que influenciam a pungência dos frutos e as diferentes cultivares de pimento Padrón utilizadas atualmente, surgem certas questões de interesse: Como é que a pungência varia ao longo do ano? De que forma cada cultivar influencia a pungência ao longo da época de colheita? Será que os híbridos F1 mantêm as características pungentes das cultivares tradicionais?

Para responder a estas perguntas, realizou-se um ensaio de campo com 4 cultivares (2 de polinização livre e 2 híbridas F1) e colheram-se amostras em diferentes datas para se estudar tanto a influência da cultivar como a da data de colheita. Entre datas de colheita registaram-se condições climáticas diferentes e procurou-se identificar o seu efeito no teor de capsaicinoides.

Com a aleatoriedade da pungência nos pimentos Padrón, também se vai de encontro a outras questões de interesse: De que forma o tamanho dos pimentos influencia a pungência? Será que há aleatoriedade da pungência entre frutos da mesma planta?

Do mesmo ensaio, realizou-se uma colheita de um fruto pequeno e de um fruto grande por planta, de várias plantas das cultivares de polinização livre. Com os teores de capsaicinoides dessas amostras, procurou-se encontrar correlação entre a massa do fruto e a sua pungência e estudar a influência da planta na pungência dos seus frutos.

O ensaio de campo foi realizado em duas parcelas disponibilizadas por uma exploração agrícola na União de Freguesias da Chamusca e Pinheiro Grande, Santarém. A condução da cultura seguiu os sistemas padrão de cultivo de pimento Padrón presentes na bibliografia. Todas as amostras depois de colhidas foram secas à temperatura ambiente e armazenadas até à análise em laboratório.

A quantificação da pungência foi feita em *Scoville Heat Units*, através do método de Todd Jr. *et al.* (1977). Para esta quantificação é necessário conhecer o teor de capsaicinoides das amostras e o valor da pungência de cada um desses capsaicinoides em SHU.

Para a quantificação da pungência, usou-se um dos métodos mais fiáveis atualmente, a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), sendo que os padrões usados foram extratos de capsaicina e dihidrocapsaicina (extratos preparados das substâncias puras adquiridas à empresa Sigma-Aldrich). Neste tipo de análise, obtém-se o teor e tipo de capsaicinoides de cada amostra de forma precisa e eficiente. A secagem e moenda das amostras, a preparação dos extratos e a análise por HPLC foram realizadas nos laboratórios do Instituto Superior de Agronomia na Quinta do Marquês, Oeiras.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Origem e dispersão do pimento Padrón

O pimento Padrón é uma variedade de pimento (*Capsicum annuum* L.) muito tradicional e conhecida do noroeste espanhol, mais concretamente da Galiza. De acordo com Rodriguez Bao *et al.* (2004) e Leira *et al.* (2006), as primeiras sementes desta variedade foram trazidas do México por monges franciscanos durante o séc. XVII, para o convento de Herbón, situado no município de Padrón. Segundo o Consejo Regulador de la DOP “Pemento de Herbón” (2010), no final do século XVIII já se comercializava o pimento seco e moído, e o processo de seleção de variedades e as práticas culturais de colheita precoce começaram então a ser transmitidos a partir da comunidade monástica aos agricultores na sua área de influência, formando um sistema de produção altamente especializado.

Atualmente, esta variedade é cultivada em Espanha em regime extensivo nas províncias de La Coruña, e Ourense, na Galiza (Pita da Veiga, 1993; Leira *et al.*, 2005) e tem vindo a crescer também nas províncias de Almería, Alicante e Múrcia no Sul de Espanha (SAT Canarisol, 2013). Segundo Estrada *et al.* (1998), o pimento Padrón é a variedade com maior importância comercial na Galiza graças à sua grande aceitabilidade no mercado de hotaliças em fresco.

Em 2010, em Espanha, a variedade do pimento Pádrón obteve o reconhecimento de Denominação de Origem Protegida (DOP) como “*Pemento de Herbón*” ou “*Pimiento de Herbón*”. O seu logótipo oficial está apresentado na Figura 1 (Consejo Regulador de la DOP “Pemento de Herbón”, 2010). O organismo responsável pela inspeção, análise, controlo dos registos, processos de produção, embalagens e certificação do produto é o Instituto Galego de Calidade Agroalimentaria (INGACAL).

Os pimentos comercializados com esta denominação têm de ser produzidos na Galiza nos municípios de Padrón, Dodro ou Rois. A sua época de comercialização é entre Maio e Outubro, o que faz com que os produtores marroquinos tenham maior potencial de crescimento visto que têm condições para produzir pimentos Padrón todo o ano. Embora este produto DOP seja o mais cobiçado, quase metade da produção espanhola de pimento Padrón localiza-se no sul do país (Consejo Regulador de la DOP “Pemento de Herbón”, 2010).



Figura 1 - Logótipo oficial da DOP “Pemento de Herbón” (Consejo Regulador de la DOP “Pemento de Herbón”, 2010).

No resto do mundo, a produção de pimento Padrón tem vindo a crescer. Nos últimos 10 anos, Marrocos tornou-se o maior país exportador e, em Portugal, esta cultura tem vindo a ganhar dimensão na região do Oeste e do Minho (Sequeiro, 2006).

2.2. Descrição da variedade do pimento Padrón

O pimento Padrón é uma variedade da espécie *Capsicum annuum* L. da família das Solanáceas como descrito no Quadro 1.

Quadro 1 - Classificação botânica do pimento (Almeida, 2006).

Família	<i>Solanaceae</i>
Subfamília	<i>Solanoideae</i>
Tribo	<i>Solaneae</i>
Género	<i>Capsicum</i>
Secção	<i>Capsicum</i>
Espécie	<i>Capsicum annuum</i> L.

A planta de pimento Padrón (Figura 2) é cultivada como anual em regiões de clima temperado. Normalmente, a planta é um arbusto herbáceo, embora o seu caule se torne lenhoso com a idade, a sua altura varia entre 50cm e 150cm e, geralmente, tem um porte ereto (Pita da Veiga, 1993).

As folhas são inteiras, de inserção alterna, são ovadas ou lanceoladas, podem ser glabras ou pubescentes. A sua base é arredondada, o vértice muito pronunciado e o pecíolo comprido.

As inflorescências surgem pedunculadas e opostas às folhas, e têm entre uma e quatro flores. As flores são simples, hermafroditas, de corola simpétala rodada a campanulada com 5 a 7 pétalas. A sua coloração varia entre o branco, branco-púrpura ou púrpura (Pita da Veiga, 1993).



Figura 2 - Frutos de pimento Padrón (esquerda). Planta de pimento Padrón em floração (direita).

O fruto é polispérmico, pode ser entre bilocular e heptalocular, e apresenta heterogeneidade na forma e cor (Figura 2). Em geral, assemelha-se a um pimento verde normal de pequenas dimensões, isto é, um pimento com 4-7cm de comprimento, 1-2cm de diâmetro da base e cerca de 15g de peso total (Rodríguez Bao *et al.*, 2004). Segundo Santos (2009), o fruto é verde no estado imaturo e, conforme o estado de maturação, a sua cor vai evoluindo para púrpura e de seguida para vermelho; a coloração verde deve-se à clorofila, a púrpura às antocianinas e o vermelho aos carotenóides. Com a evolução do estado de maturação, o fruto vai se tornando mais oco, pois o desenvolvimento da placenta não consegue acompanhar o crescimento do pericarpo (Santos, 2009).

As sementes de cor amarelo-pálido são arredondadas, ligeiramente subreniformes e achatadas. Têm um diâmetro de, aproximadamente, 1-3mm e inserem-se na placenta no interior do fruto (Pita da Veiga, 1993; Rodríguez Bao *et al.*, 2004).

Os frutos apresentam grandes teores de água e baixa concentração de hidratos de carbono e proteínas, o que faz com que tenham baixos níveis calóricos. No entanto, são ricos em minerais, fibras e vitaminas, como a C e a A (SAT Canarisol, 2013). Segundo a FatSecret Espanha (2017), 100g de pimentos Padrón apresentam 21kcal, 0,9g de proteína, 5,1g de hidratos de carbono, e 0,1g de gordura.

Esta variedade é vulgarmente reconhecida pelas características organolépticas dos seus frutos, mais concretamente pela sua pungência moderada. Poucos são os pimentos que são pungentes e, quando o são, o nível de picante é bastante reduzido. Esta característica tem vindo a ser mais evidenciada pela seleção de plantas que os agricultores galegos têm feito desde a variedade originalmente picante. Esta aleatoriedade da pungência entre os frutos é o que tem vindo a despertar o interesse dos consumidores.

2.3. A cultura do pimento Padrón

O pimento Padrón, assim como as restantes variedades desta espécie, é uma cultura de estação quente. As técnicas culturais assemelham-se em muito à das outras solanáceas, como a beringela e o tomate para consumo em fresco.

De acordo com Rodriguez Bao *et al.* (2004) e Leira *et al.* (2006), a produção de pimento Padrón pode ser feita em estufa ou ao ar livre, com a plantação entre os meses de Fevereiro e Abril e a colheita entre os meses de Maio e Setembro. Contudo, na cidade de Agadir em Marrocos, é possível plantar e produzir durante o ano todo graças ao clima mais quente que essa zona apresenta (Sequeiro, 2006).

Segundo Leira *et al.* (2006) e o Consejo Regulador de la DOP “Pemento de Herbón” (2010), a temperatura média anual mais favorável à produção é de 15°C e temperaturas inferiores a 5°C causam danos nas plantas. Por outro lado, num estudo mais antigo sobre o pimento Padrón, Pita da Veiga (1993) sugere temperaturas mais elevadas: temperaturas diurnas entre os 20°C e os 25°C e temperaturas noturnas entre os 16°C e os 18°C. Estes últimos valores de temperatura situam-se nos intervalos apresentados por Almeida (2006) para a generalidade do género *Capsicum*.

Para a germinação das sementes de pimento Padrón, os valores apresentados por Pita da Veiga (1993) são similares aos apresentados por Almeida (2006): a germinação ocorre entre 13°C e os 37°C, sendo que a maior taxa de germinação se situa entre os 20°C e os 30°C.

O pimento Padrón é indiferente ao fotoperíodo e requer luz intensa durante todo o ciclo vegetativo, especialmente na floração. Em situações de falta de luz, a floração apresenta-se mais reduzida e as flores são bastante débeis, verifica-se ainda o alongamento dos entrenós e os caules tornam-se frágeis, deixando de suportar o peso dos frutos (Pita da Veiga, 1993).

Este pimento requer humidade relativa na ordem dos 50-70%, especialmente na floração e vingamento dos frutos (Pita da Veiga, 1993).

Ainda segundo Pita da Veiga (1993), os solos deverão apresentar uma textura entre o argiloso e o limo-arenoso, mas em qualquer situação o solo deverá drenar com facilidade pois esta é uma cultura que sofre bastante de asfixia radicular e de doenças criptogâmicas. Já no trabalho de Leira *et al.* (2006), os autores defendem que os solos mais propícios devem ter uma espessura considerável, baixa pedregosidade superficial, textura franco-arenosa, um bom arejamento e pH entre 6,5 e 7,0.

Segundo Rodriguez Bao *et al.* (2004), a densidade de plantação deverá ser entre 2 e 4 plantas por m², e as produtividades resultantes rondam as 32 toneladas/ha em estufa e 20 toneladas/ha ao ar livre. Já no trabalho mais recente de Leira *et al.* (2006), a densidade de plantação pode oscilar entre 1,7 e 3,2 plantas/m² e as médias de produção em estufa e ao ar livre são de 60 t/ha e 35 t/ha, respectivamente.

As exigências hídricas do pimento em climas temperados a quentes estimam-se em cerca de 400 a 800mm para todo o ciclo cultural. É recomendado por Almeida (2006) que se recorra a sistemas de rega localizada para se evitar a propagação de doenças como o míldio. Excesso de água pode levar à morte de plantas por asfixia ou doenças radiculares se as condições de saturação se manterem por mais de 24 horas, e pode também provocar abortamento floral. O défice hídrico contribui para a queda das flores e de pequenos frutos e para a necrose apical nos frutos, este último acidente fisiológico pode ocorrer também se os teores de água no solo apresentarem irregularidades acentuadas (Almeida, 2006).

O pimento é uma cultura sensível à falta de cálcio e de magnésio, o potássio é absorvido pelas plantas principalmente na fase do crescimento dos frutos e o azoto deve ser disponibilizado fraccionado ao longo do ciclo devido à sua mobilidade (Almeida, 2006). A exportação de nutrientes pela cultura do pimento está apresentada na Quadro 2.

Quadro 2 - Exportação de nutrientes pela cultura do pimento (Almeida, 2006).

N (kg/ha)	P ₂ O ₅ (kg/ha)	K ₂ O (kg/ha)	CaO (kg/ha)	MgO (kg/ha)
201,0	53,0	269,0	160,0	40,6

2.5. Capsaicinoides e pungência

Segundo Iwai *et al.* (1979), o princípio pungente do pimento deve-se a um grupo de compostos derivados de capsaicina, chamados capsaicinoides.

Este grupo funciona como mecanismo de defesa das plantas contra animais herbívoros através da sua pungência, isto é, a sensação irritante e de queimadura nos mamíferos, ou seja estimulam as terminações nervosas químico-recetoras na pele desses animais (Narasimha Prasad *et al.*, 2006). Contudo pode ter outras funções: atuam como anti-fúngico e anti-bacteriano nas sementes de modo a protegê-las e promover a sua germinação (García-Galindo *et al.*, 1995); e, devido à imunidade das aves à pungência, estas podem contribuir para disseminar as sementes (Tewksbury *et al.*, 2006).

Os alimentos pungentes são procurados para diferentes tipos de culinária, no entanto os capsaicinoides têm outros usos, como por exemplo na medicina, onde podem ser usados como agentes anti-inflamatórios, ou no controlo de diabetes, de dores de cabeça, da obesidade ou até no tratamento de cancro; ou na defesa pessoal, pois a capsaicina é o ingrediente principal do gás-pimenta (Mortensen e Mortensen, 2009).

Embora existam onze capsaicinoides presentes no género *Capsicum* (Maillard *et al.*, 1997; Karnka *et al.*, 2002), Contreras-Padilla e Yahia (1998) provaram que cerca de 80-90% da pungência é provocada por apenas dois destes compostos: capsaicina e dihidrocapsaicina.

2.5.1. Capsaicinoides

Os capsaicinoides estão presentes, maioritariamente, nos tecidos da placenta. Contudo, é de ideia geral que se encontram nas sementes, visto que nos frutos depois de processados (secagem e torra), os capsaicinoides são absorvidos pelas sementes. A pungência do fruto vai aumentando desde a base até ao ápice. (Santos, 2009).

Vários estudos demonstraram que o teor de capsaicinoides está relacionado com a idade do fruto, com o seu tamanho e com o seu estado de maturação (Sakamoto *et al.*, 1994; Estrada *et al.*, 1997). Os resultados são similares visto que os capsaicinoides começam a acumular-se no fruto no início do seu desenvolvimento e atingem os teores máximos quando o fruto se aproxima do fim do desenvolvimento.

A concentração de capsaicinoides também varia consoante a cultivar de pimento (Govindarajan *et al.*, 1987). E ainda pode ser afetada por fatores externos como a temperatura, água no solo e fertilização (Estrada *et al.*, 1998, 1999).

Todos estes resultados vão de encontro ao estudo de Iwai (1979) que sugere que os níveis de pungência dos pimentos são determinados por dois tipos de fatores: factores genéticos da planta e factores de interação da planta com o ambiente.

Os capsaicinoides são metabolitos secundários sintetizados pela condensação da vanililamina, proveniente da via dos fenilpropanoides, e de uma porção de acil-coenzima A, proveniente da via dos ácidos gordos (Díaz *et al.*, 2004).

A estrutura dos capsaicinoides é um fator chave nas suas propriedades químicas. As moléculas são compostas por um anel hexagonal de átomos de carbono ligado a uma cadeia que contém uma porção longa de hidrocarbonetos. Este anel hexagonal e o grupo funcional que o acompanha formam um grupo vanililo (Mortensen e Mortensen, 2009).

Ainda segundo Mortensen e Mortensen (2009), os capsaicinoides são classificados como alcalóides cristalinos, ou seja, compostos que contêm uma base de azoto e que são encontrados em plantas. Estas substâncias pertencem a uma família maior de produtos químicos denominados de vanilóides, compostos que contêm o grupo vanililo.

Existem cinco capsaicinoides de ocorrência natural: capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina e homocapsaicina. Segundo os trabalhos de Gonçalves (2009) e de Mortensen e Mortensen (2009), o composto capsaicina é responsável por 69% da pungência dos pimentos, sendo assim considerado um dos dois capsaicinoides principais. A dihidrocapsaicina é responsável por 22% da pungência, logo é também considerada como capsaicinoide principal. Os restantes capsaicinoides representam os 9% em falta e serão, por essa razão, desprezados neste trabalho.

2.5.1.1. Capsaicina

A capsaicina, ou 8-metil-N-vanilil-trans-6-nonanamida, apresenta uma fórmula química de $C_{18}H_{27}NO_3$ (Karnka *et al.*, 2002; Mortensen e Mortensen, 2009) e uma estrutura molecular como representado na Figura 3.

Este composto é um metabolito secundário, biossintetizado pela enzima capsaicina sintetase (CS) através da condensação da vanililamina (um intermediário da via dos fenilpropanoides) e de um ácido gordo, ácido 8-metil-6-nonanóico, presente nos tecidos placentários dos seus frutos (Narasimha Prasad *et al.*, 2006; Topuz e Ozdemir, 2007).

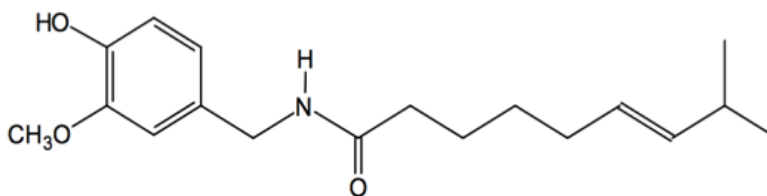


Figura 3 - Estrutura molecular da capsaicina (Othman *et al.*, 2011).

Na sua biossíntese, a fenilalanina entra na via dos fenilpropanoides, onde é convertida em ácido cinâmico pela ação da enzima fenilalanina amónia liase e passa por outras etapas enzimáticas que levam à síntese de ácido ferúlico. De seguida, os passos do ácido ferúlico até à formação de vanilina ainda não estão bem estudados, no entanto, já está claro que a conversão da vanilina em vanililamina é catalisada por uma aminotransferase. O ácido 8-metil-6-nonanóico é formado a partir de três unidades de acetato e de isobutiril-coenzima A, que por sua vez é um intermediário do catabolismo do aminoácido valina (Díaz *et al.*, 2004).

2.5.1.2. Dihidrocapsaicina

A dihidrocapsaicina, ou 8-metil-N-vanilil-nonanamida, apresenta uma fórmula química de $C_{18}H_{29}NO_3$ (Karnka *et al.*, 2002; Mortensen e Mortensen, 2009) e uma estrutura molecular como representado na Figura 4.

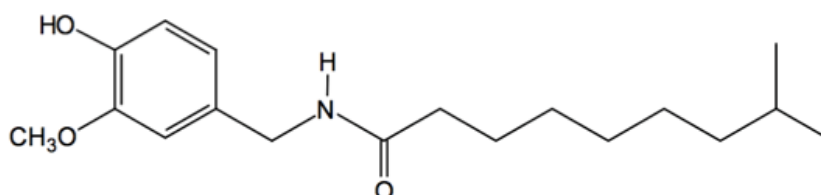


Figura 4 - Estrutura molecular da dihidrocapsaicina (Othman *et al.*, 2011).

De acordo com Mortensen e Mortensen (2009), este composto é um capsaicinoide análogo da capsaicina, tem a mesma estrutura que a capsaicina, com exceção de ter mais dois átomos de hidrogénio que substitui uma ligação dupla de carbono na cadeia de hidrocarbonetos.

A biossíntese da dihidrocapsaicina tem muitas semelhanças à biossíntese da capsaicina. A molécula surge da condensação de vanililamina (mesmo composto proveniente da via dos fenilpropanoides) e de ácido 8-metilnonanóico, ácido gordo também formado a partir do aminoácido valina que origina o ácido 8-metil-6-nonanóico através da enzima 8-MNAD (ácido

8-metil-6-nonanóico desidrogenase) na síntese da capsaicina (Díaz *et al.*, 2004; Topuz e Ozdemir, 2007).

2.5.2. Determinação da pungência

2.5.2.1. Teste de Scoville

O teste de Scoville é um método de determinação da pungência dos alimentos baseado num teste organoléptico desenvolvido pelo farmacêutico Wilbur Scoville em 1912. Os alimentos são avaliados em Unidades de Calor de Scoville (*Scoville Heat Units*).

Quadro 3 - Escala de Scoville (Alves, 2015).

Escala	Tipo de Pimenta
0	Pimentão doce não picante
100-500	Pimentão picante
500-1.000	Pimenta anaheim
600-800	Molho Tabasco
1.000-1.500	Poblano
1.500-2.500	Rocotilo
2.500-8.000	Jalapenho
5.000-10.000	Pimenta de cera (USA)
7.000-8.000	Habanero Tabasco
10.000-23.000	Serrano
30.000-50.000	Pimenta-de-caiena
50.000-100.000	Malagueta e pimenta tailandesa
100.000-200.000	Pimenta-da-jamaica
100.000— 350.000	Habanero do Chile
350.000-577.000	Habanero (Redsavina)
876.000-970.000	DorsetNaga
855.000-1.041.427	Nagajolokia
2.000.000-5.300.000	Spray de pimenta padrão
9.100.000	Nordihidrocapsaicina — alcalóide atenuado
15.000.000-16.000.000	Capsaicina — alcalóide isolado

Neste teste, utilizam-se extratos de pimentos pungentes e água com açúcar, um painel de provadores vai provando progressivamente diluições dessa solução até 3 de 5 provadores deixarem de sentir a sensação de ardor no paladar. A mensurabilidade dos capsaicinoides é determinada, em partes por milhão, através do grau de diluição, pois sabe-se qual o volume da solução do extrato e o volume necessário de água açucarada para neutralizar a pungência.

A concentração de capsaicinoides, depois de transposta para o peso seco dos alimentos, corresponde a partes por milhão de capsaicinoides pela massa seca dos alimentos (mg capsaicinoides / kg alimento). E após Scoville (1912) definir a proporção para Scoville Heat Units: Uma parte por milhão de capsaicinoides equivale a 15 SHU; foi possível deduzir uma equação para outros métodos de determinação da pungência:

$$SHU = [Concentração \text{ de Capsaicinoides (mg / kg fruto)}] * 15,0.$$

A escala varia entre 0 SHU até 16×10^6 SHU, valor correspondente à capsaicina pura, como demonstrado no Quadro 3 (Mortensen e Mortensen, 2009). Cada produto alimentar tem um intervalo de valores de pungência e não um valor exato pois é necessário ter em consideração o efeito de factores externos nos teores de capsaicinoides, sendo mais correto assumir que cada alimento varia na pungência entre os dois valores apresentados.

O teste de Scoville, devido à imprecisão e subjetividade do paladar humano, torna-se um método demasiado falível. Tem a vantagem de expressar o grau de pungência independente dos compostos presentes, no entanto não possibilita o estudo de cada capsaicinoide em separado. Naturalmente que este tipo de teste subjetivo, embora ainda seja usado hoje-em-dia, tem vindo a ser substituído por um método replicável e padronizado, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), que já torna possível estudar os diferentes capsaicinoides em separado, é mais rápido e rigoroso, e exige menos mão-de-obra.

2.5.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma forma específica de cromatografia em coluna, utilizada, geralmente, em análises para separar, identificar e quantificar compostos ativos. É uma técnica de cromatografia que utiliza como fase móvel um líquido e separa os componentes de uma amostra pela interação entre a fase estacionária e a fase móvel através de equipamentos sofisticados (Malviya *et al.*, 2010).

Ainda segundo Malviya *et al.* (2010), o equipamento é composto pela bomba, injetor, coluna e detetor. O tipo de sistema usado neste trabalho foi um equipamento de HPLC com coluna de fase reversa. Este HPLC tem uma fase estacionária não polar e uma fase móvel aquosa, moderadamente polar. A amostra a ser analisada é introduzida em pequeno volume no fluxo da fase móvel e é retardada por interações químicas ou físicas específicas com a fase estacionária. O HPLC opera com base no princípio das interações hidrofóbicas, que resultam de forças repulsivas entre um solvente polar, o composto a analisar relativamente não polar e a fase estacionária não polar. A ligação do composto à fase estacionária é proporcional à área de

superfície de contacto em torno do segmento não polar da molécula de composto por associação com o ligando no solvente aquoso. A quantidade de retardamento depende da natureza do composto a ser analisado e da composição tanto da fase estacionária como da fase móvel. O tempo que um composto específico leva a sair da coluna é chamado de tempo de retenção. Os solventes comuns utilizados incluem quaisquer combinações miscíveis de água ou líquidos orgânicos (os mais comuns são metanol e acetonitrilo), e neste caso, a fase móvel escolhida foi uma solução de acetonitrilo:água (70:30, volume/volume).

Foi escolhido este método para a determinação da pungência das amostras devido à sua sensibilidade adequada para análise de concentrações de capsaicinoides em pimentos e por ser o método mais usado em trabalhos similares com pimentos como é o caso dos estudos de Sakamoto *et al.* (1994), Estrada *et al.* (1997; 1998; 1999), Karnka *et al.* (2002), Sánchez *et al.* (2005) e Santos (2009).

3. Material e métodos

3.1. Descrição do ensaio

Os dados experimentais foram obtidos a partir de um ensaio realizado no Casal do Coelho - Estrada Nacional 118 nº 12, União de Freguesias da Chamusca e Pinheiro Grande, Santarém (latitude: 39°23'54"N, longitude: 8°26'09"W), onde foram utilizadas duas parcelas de 75 m² com 3 m de largura e 25 m de comprimento. Uma das parcelas ficou ao ar livre enquanto que na outra se instalou uma estufa de polietileno transparente, em que se manteve sempre as paredes laterais abertas, logo a temperatura nunca variou mais do que 2°C. Cada parcela correspondeu a uma repetição.

Antes da plantação, ambas as parcelas foram mobilizadas com um vibrocultor e o solo foi coberto com filme de polietileno negro. A plantação foi no dia 12 de Março de 2016, com uma densidade de plantação de 2 plantas/m², o que correspondeu a um total de 300 plantas, disponibilizadas pelos Viveiros da Silveira.

Desse conjunto de plantas, encontram-se as 4 cultivares em estudo: 50 exemplares um cultivar híbrido de Padrón (denominado de P_d), 50 exemplares de um segundo híbrido de Padrón (denominado de P_p), 100 exemplares de uma cultivar de polinização livre de Padrón (denominada de P₁), e 100 exemplares de uma segunda cultivar de polinização livre de Padrón (P₂). Como as cultivares Padrón 1 e Padrón 2 são cultivares de polinização livre, apresentam grande variabilidade interna, logo escolheu-se um maior número de exemplares para se ter maior dimensão das populações mais aleatórias.

Cada parcela foi plantada com três linhas espaçadas de 1 metro e com uma entrelinha de 50 cm. Cada linha recebeu 50 plantas: 15 de Padrón 1, 15 de Padrón 2, 8 de Padrón p, 8 de Padrón d, e 2 exemplares de guarda nas extremidades. Os exemplares de cada cultivar foram plantados seguidos em cada linha, contudo a ordem das cultivares foi aleatória. Após a casualização da ordem das cultivares, as cultivares foram plantadas conforme o esquema (Figura 5), ficando um bloco (repetição) ao ar livre e o outro bloco (repetição) numa estufa tipo túnel. Contudo, os lados da estufa ao estarem sempre abertos, o seu efeito no aumento da temperatura foi insignificante, sendo os dois blocos utilizados unicamente como repetições.

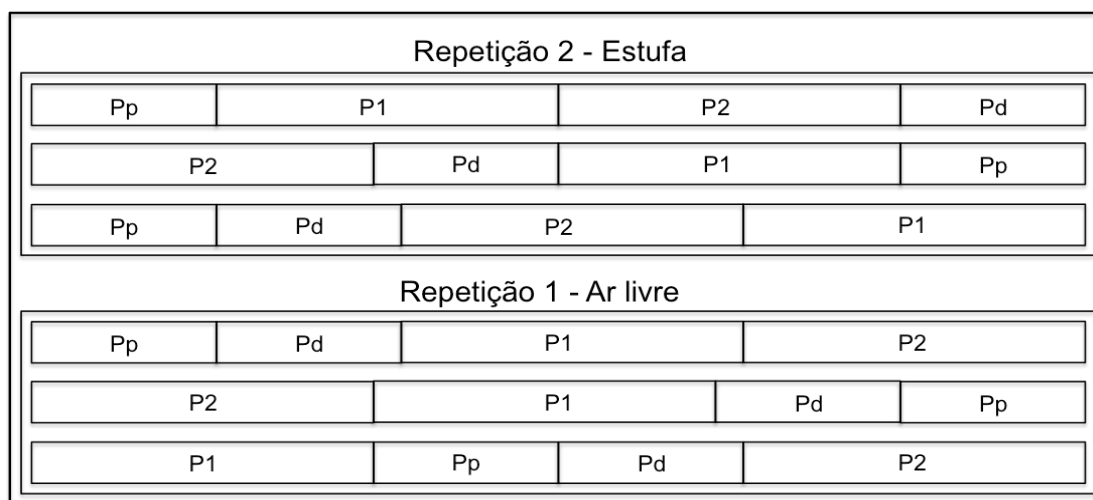


Figura 5 - Esquema da plantação do ensaio.

Toda a condução da cultura, exceto a fertilização, seguiu as etapas dos sistemas de produção de pimento Padrón encontradas na bibliografia (Pita da Veiga, 1993; Estrada *et al.*, 1997, 1998, 1999; Rodriguez Bao *et al.*, 2004; Leira *et al.*, 2006; Consejo Regulador de la DOP “Pemento de Herbón”, 2010). Para a fertilização, teve de recorrer-se ao trabalho de Almeida (2006) sobre pimentos por falta de dados na bibliografia.

Optou-se por um sistema de rega localizada: fita de rega gota-a-gota com gotejadores com espaçamento de 25cm, que foi instalada entre o solo e o filme de polietileno. A água utilizada para rega era proveniente de um furo que já existia na exploração. A dotação total de rega foi de 570mm de água fornecidos ao longo do ciclo cultural.

A aplicação de fertilizantes dividiu-se entre uma adubação de fundo e três adubações por fertirrigação que totalizou uma aplicação de 2,400kg/m² de azoto (N), 0,500kg/m² de fósforo (P₂O₅), 1,800kg/m² de potássio (K₂O), 0,242kg/m² de magnésio (MgO) e 0,242kg/m² de cálcio (CaO). Segundo a análise de terras realizada antes da instalação da cultura, não havia necessidade de se aplicar fósforo, no entanto, um dos adubos disponíveis tinha esse nutriente na sua composição.

Quanto a tratamentos fitossanitários, foi necessário aplicar o produto *Confidor Classic* (Bayer) no combate a piolhos, tripes e lagartas e o produto *Quadris Max* (Bayer) no combate a um ataque de míldio.

Acredita-se que todas estas operações tenham um efeito aleatório nos resultados do ensaio pois foram sempre aplicados homogeneamente nas duas parcelas.

No fim da última colheita (5 de Setembro de 2017), o ensaio tinha o aspeto apresentado na Figura 6.



Figura 6 - Parcela com estufa no dia da última colheita.

Para o estudo da influência da época de colheita, instalaram-se registadores de temperatura Hannacom HI 143-10 no centro de cada parcela para se registar a temperatura. Os registadores foram programados de modo a criarem registos de hora a hora durante todo o ciclo cultural.

As cinco colheitas das amostras da primeira parte do trabalho foram realizadas a 5 de Julho, 23 de Julho, 6 de Agosto, 22 de Agosto e 5 de Setembro. A colheita do segundo estudo coincidiu com a última colheita: 5 de Setembro.

As etapas seguintes pós-colheita de preparação das amostras (secagem e moenda), de extração dos capsaicinoides e de análise dos teores de capsaicinoides (através de HPLC) foram realizadas nos laboratórios do Instituto Superior de Agronomia na Quinta do Marquês, Oeiras, de Outubro de 2016 a Abril de 2017.

3.2. Amostragem

Para o estudo da influência da cultivar e da época de colheita, foram seleccionadas 40 amostras do ensaio realizado no campo. Estas amostras dividem-se pelas quatro cultivares, pelas duas repetições (ar livre e estufa) e por cinco datas de colheita.

$$4 \text{ Cultivares} \times 5 \text{ Datas de Colheita} \times 2 \text{ Repetições} = 40 \text{ Amostras}$$

As cinco datas de colheita escolhidas foram: 5 de Julho, 23 de Julho, 6 de Agosto, 22 de Agosto e 5 de Setembro. Em cada uma delas foram selecionadas amostras de 9 frutos das quatro cultivares diferentes e de cada parcela.

Os critérios de seleção para colheita foram: frutos de cor verde escura com cerca de 5-7 cm de comprimento, 1-2 cm de largura na base e enrugados no ápice.

Após a colheita, removeram-se os pedicelos dos pimentos das amostras, e de seguida cada amostra foi pesada (uma média de 126,2 g por amostra) e deixada a secar em pratos numa sala fechada de modo a não perderem as propriedades até à análise em laboratório.

Para o estudo da correlação do tamanho e da pungência dos pimentos foram colhidas as amostras no dia 5 de Setembro de 2016 das cultivares de polinização livre por apresentarem maior variabilidade interna e, consequentemente, maior variabilidade nos teores de capsaicinoides. Foram selecionadas 23 plantas da cultivar Padrón 1 e 23 da cultivar Padrón 2, e colheu-se um fruto de pequena dimensão e um fruto de grande dimensão de cada planta, o que correspondeu a um total de 92 amostras.

$$2 \text{ Cultivares} \times 23 \text{ Plantas} \times 2 \text{ Tamanhos de Fruto} = 92 \text{ Amostras}$$

Os critérios de seleção para colheita foram: frutos de cor verde escura com cerca de 4-10 cm de comprimento e enrugados no ápice.

Tal como no primeiro estudo, após a colheita, os pedicelos dos frutos foram removidos, as amostras foram pesadas (uma média de 12 g por amostra) e deixadas a secar em recipientes numa sala fechada de modo a não perderem as propriedades até à análise em laboratório.

3.3. Preparação das amostras

Como preparação das amostras e seguindo certas etapas do melhor método apresentado por Santos (2009) no seu trabalho com pimentos, as amostras foram secas numa estufa de secagem Heraeus a 60 °C até atingirem peso constante. De seguida foram moídas num moinho de cone elétrico MIAG a uma granulometria igual ou inferior a 30 *mesh* (600 µm), foram necessárias cerca de 5 passagens pelo moinho até toda a amostra atingir a granulometria desejada. Utilizou-se um moinho de cone e não um moinho de facas como Santos (2009) pois era o que existia no laboratório.

Entre etapas e durante todo o processo, as amostras foram armazenadas num exsiccador de modo a não ganharem humidade.

3.4. Extração dos capsaicinoides

O método de extração dos capsaicinoides das amostras foi baseado no método utilizado por Sánchez *et al.* (2005): num balão de Erlenmeyer de 50 mL foram diluídos 1,000 g da amostra em 10 mL de acetonitrilo (Sigma-Aldrich); posteriormente, o balão, vedado com papel de alumínio foi colocado num banho de água (P. Selecta Unitronic OR) a 60 °C com agitação a 50 U/min durante 5 horas.

Karnka *et al.* (2002) ao compararem os solventes metanol, acetona e acetonitrilo para extração de capsaicinoides demonstraram que o acetonitrilo é o mais eficiente. Sendo então este uma boa escolha como solvente para este trabalho.



Figura 7 - Extratos em acetonitrilo (esquerda). Banho-maria de agitação P. Selecta Unitronic OR (direita).

Não se procurou usar outro tipo de recipiente pois Santos (2009) demonstrou que o balão de Erlenmeyer optado por Sánchez *et al.* (2005) é mais eficiente que outros tipos de recipientes (como por exemplo os tubos de ensaio) na extração. Nesse mesmo trabalho de Santos (2009), embora se tenha também demonstrado que 7 horas de banho-maria seria mais eficiente, optou-se por apenas 5 horas devido à considerável economia de tempo e aos valores obtidos serem também satisfatórios.

Os extratos foram arrefecidos à temperatura ambiente durante cerca de 30 minutos e sujeitos a centrifugação numa centrifugadora Sigma-Aldrich 3K30. De seguida, retiraram-se cerca de 2 mL que foram filtrados com uma seringa Ruthe de 5ml para tubos de Eppendorf e armazenados a -18 °C até a análise por HPLC.

Certas amostras do segundo estudo, depois de secas e moídas, não tinham massa suficiente para completar os 1,000 g necessários para a diluição em 10 mL de acetonitrilo. Nesses casos, fez-se o extrato com a massa existente na mesma proporção massa:volume.

3.5. Análise por HPLC

O sistema cromatográfico usado na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência usado foi um *Beckman System Gold Chromatograph 126 Solvent Module (USA)*, constituído por um cromatógrafo líquido-líquido e um detetor de fotodíodos (*168 Detector*). Na injeção das amostras recorreu-se a um injetor automático Spark Holland MIDAS (o HPLC e o injetor automático utilizados estão apresentados na Figura 8). O *software* para tratamento de dados foi o *32 Karat*.

Foram injetadas automaticamente três repetições de cada amostra com um volume de 20 μL , a detecção foi a 280 nm. O sistema cromatográfico funcionou sempre com um fluxo de 1 mL/minuto, em que a fase móvel foi uma solução de acetonitrilo:água (70:30, v/v).



Figura 8 - HPLC *Beckman System Gold Chromatograph 126 Solvent Module* e injetor automático Spark Holland MIDAS utilizados.

A quantificação dos teores de capsaicinoides das amostras foi feita recorrendo a dois padrões externos: capsaicina (CAP) e dihidrocapsaicina (DH). Preparam-se as soluções-mãe com estas duas substâncias (adquiridas à empresa Sigma-Aldrich), em acetonitrilo, com uma concentração de 1,000 mg/mL, em que, com a ponderação do grau de pureza (95 % para a

CAP e 85 % para a DH), se obteve uma concentração de 0,950 mg CAP/mL e 0,850 mg DH/mL.

Por diluição das soluções-mãe em acetonitrilo, prepararam-se as soluções padrão para os 7 níveis de concentração das curvas de calibração da capsaicina (0,475 mg/mL; 0,238 mg/mL; 0,119 mg/mL; 0,059 mg/mL; 0,030 mg/mL; 0,015 mg/mL; 0,007 mg/mL) e das curvas de calibração da dihidrocapsaicina (0,425 mg/mL; 0,213 mg/mL; 0,106 mg/mL; 0,053 mg/mL; 0,027 mg/mL; 0,013 mg/mL; 0,007 mg/mL).

Depois da análise cromatográfica, o *software* 32 *Karat* apresentou os dados em forma de cromatogramas com picos representativos de diferentes substâncias. Os picos dos capsaicinoides em estudo foram integrados e as áreas resultantes foram usadas para a determinação das concentrações de capsaicina e dihidrocapsaicina através das curvas de calibração previamente determinadas através ao programa *Excel* (curvas apresentadas no ponto 4.1).

3.6. Tratamento de dados

Os primeiros resultados obtidos representam as concentrações dos capsaicinoides (massa em miligramas) nos extratos de pimentos (volume em mililitros). Para se converter os teores para volume de capsaicinoide (miligramas) por peso seco do fruto (quilogramas) recorreu-se à massa utilizada de cada amostra e aos teores de matéria seca.

Para todas as análises deste trabalho, estudaram-se os teores de cada capsaicinoide separadamente e ainda o conjunto total que representa o valor total da pungência (SHU).

Para se converter os resultados em *Scoville Heat Units*, recorreu-se ao método de Todd Jr. *et al.* (1977) que se baseia num somatório das multiplicações das concentrações de cada capsaicinoide pelas SHU correspondentes da sua substância pura:

$$\text{SHU} = [\text{Concentração de CAP (mg CAP/kg fruto)}] \times 16 + [\text{Concentração de DH (mg DH/kg fruto)}] \times 15$$

Optou-se por este método por ser mais preciso e não pelo de Scoville (1912):

$$\text{SHU} = [\text{Concentração de capsaicinoides (mg CAP/kg fruto)}] \times 15$$

Utilizaram-se os *softwares Excel e Statistix 9* para a análise estatística dos dados, realizando médias, gráficos de barras, gráficos de linhas e análises de variância para o tratamento dos dados do primeiro estudo.

Calcularam-se as médias e os respetivos desvios padrão para os resultados em teor de cada capsaicinoide e em valores de pungência por data de colheita e por cultivar. As médias das cultivares foram feitas para todos os valores de cada cultivar independentemente da data de colheita, e utilizaram-se para fazer comparações entre elas. As médias das diferentes épocas de colheita foram feitas para todos os valores de cada data de colheita independentemente da cultivar, e compararam-se os valores com a evolução dos dados climáticos obtidos pelos registadores de temperatura; realizaram-se as médias para a temperatura diária, diurna e noturna dos 21 dias antes de cada colheita; ainda se usaram dados das médias da radiação solar para se estudar uma possível influência deste factor também.

Optou-se por estudar o impacto de cada factor, e da interação entre estes, através de análises de variância. Todas as análises de variância foram realizadas para os valores da pungência, para os teores de capsaicina e para os teores de dihidrocapsaicina separadamente de modo a entender-se o efeito dos factores em cada composto individualmente. As ANOVA's tiveram como factores em estudo a data de colheita e a cultivar, assumindo sempre as duas repetições em estudo (estufa e ar livre), o que originou 12 graus de liberdade.

Na segunda parte do trabalho foram estudadas apenas as duas cultivares de polinização livre em separado. Recorreu-se à massa de cada pimento para se avaliar a influência do tamanho do fruto na pungência e diferenciou-se cada amostra pela planta donde é proveniente para se entender uma vez mais a influência de factores internos, que nestas cultivares podem variar muito de planta para planta.

Na análise estatística, estudou-se a correlação através do *software Statistix 9*. Realizaram-se testes de correlação de Pearson para se verificar se existe correlação entre a massa e a pungência das amostras e, construíram-se gráficos de dispersão para se entender a variabilidade entre os resultados consoante a massa das amostras. Posteriormente, foram realizadas análises de variância de modo a comparar-se os teores de cada capsaicinoide e os valores de pungência com a massa da amostra e a planta de onde cada amostra é proveniente. Nestas ANOVA's obteve-se 22 graus de liberdade.

4. Resultados e discussão

4.1. Identificação dos capsaicinoides

A identificação dos tempos de retenção de capsaicina e de dihidrocapsaicina foi feita através da análise dos cromatogramas das soluções-mãe dos padrões (Figura 9 e 10) e dos cromatogramas das soluções padrão (Figura 11). Verificaram-se os tempos de retenção entre 3,9 e 4,1 minutos para a capsaicina e entre 4,7 e 4,9 para a dihidrocapsaicina.

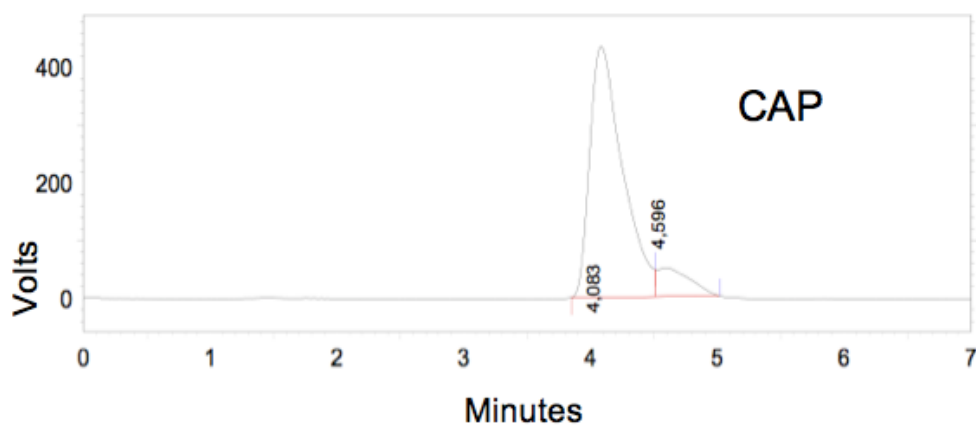


Figura 9 - Cromatograma da solução-mãe de capsaicina.

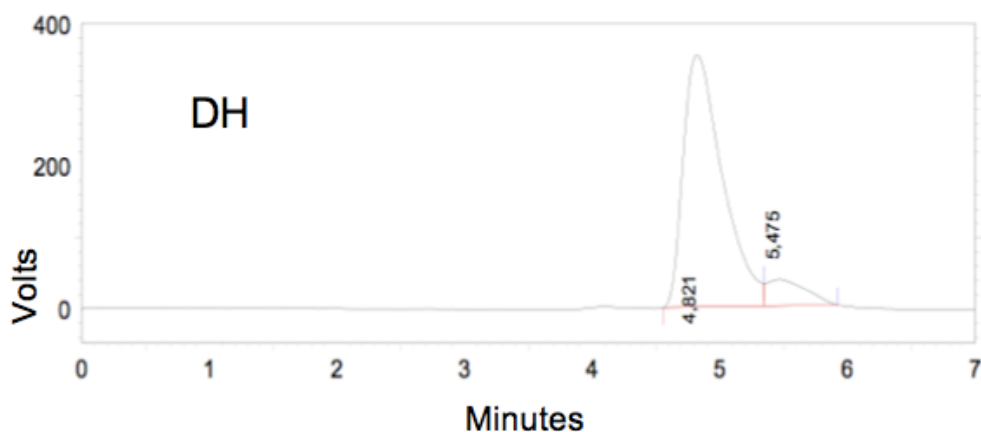


Figura 10 - Cromatograma da solução-mãe de dihidrocapsaicina.

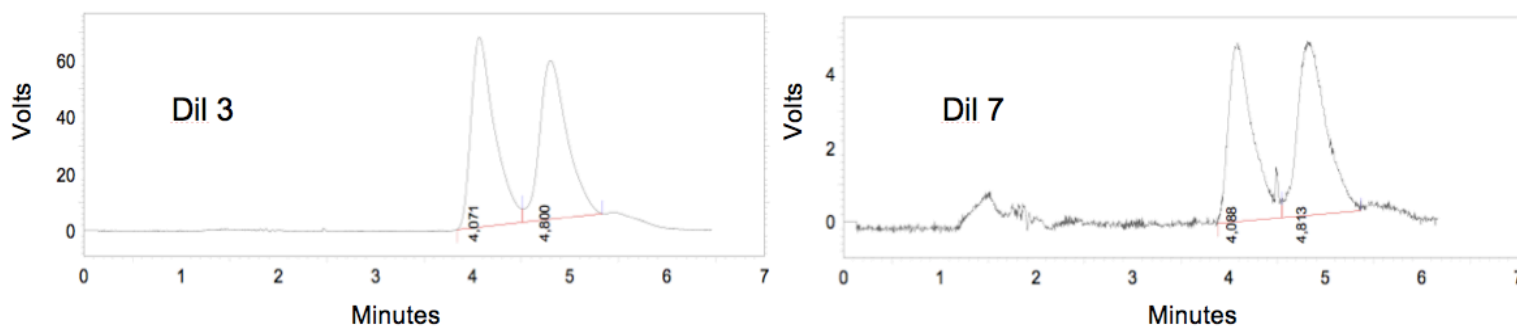


Figura 11 - Exemplo de cromatogramas das soluções padrão: diluição 3 (esquerda) e diluição 7 (direita).

As curvas de calibração (Figuras 12 e 13), apuradas através das áreas dos picos das soluções padrão, foram determinadas através de uma regressão linear, apresentando uns coeficientes de determinação bastante aceitáveis: $R^2 = 0,997$ para a capsaicina e $R^2 = 0,998$ para a dihidrocapsaicina. Embora se perca precisão das rectas, teve de se optar por fazer passar as rectas na ordenada da origem pois muitas amostras apresentam picos com áreas demasiado pequenas, e se não se tomasse essa decisão não seria possível determinar os teores de capsaicinoides para essas amostras.

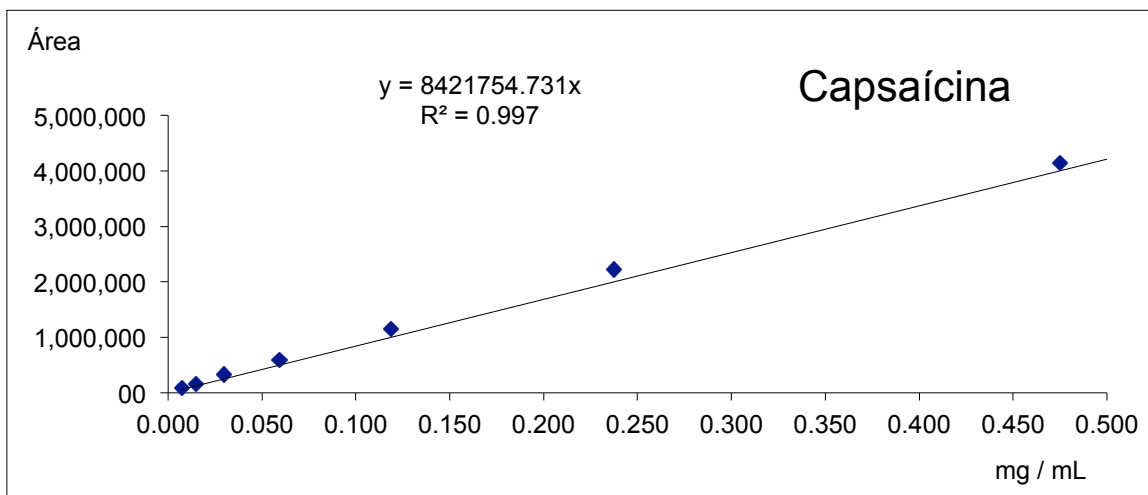


Figura 12 - Curva de calibração da capsaicina.

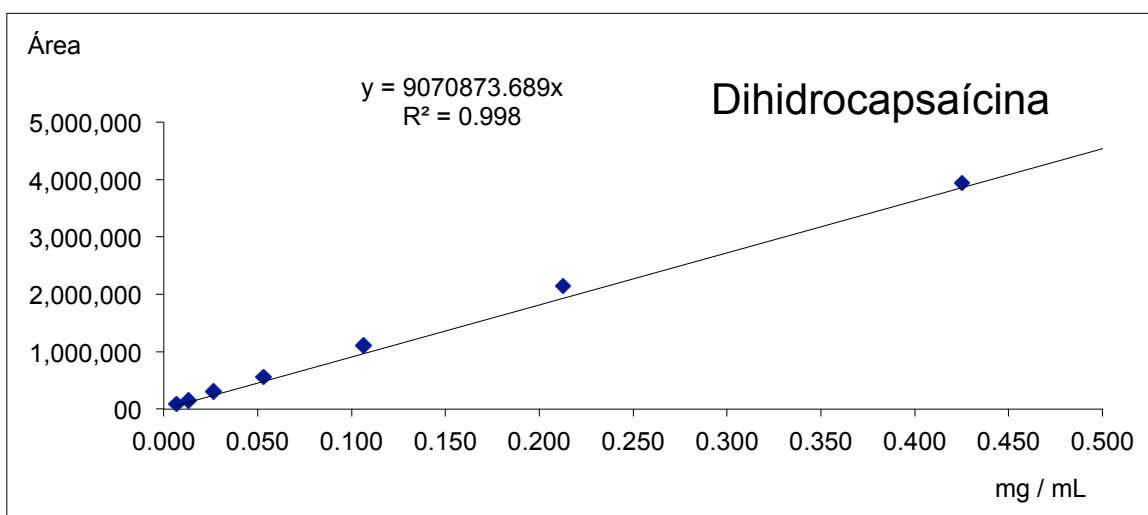


Figura 13 - Curva de calibração da dihidrocapsaicina.

Obtiveram-se 396 cromatogramas do conjunto de todas as amostras (3 repetições cada x 132 amostras). Seleccionaram-se dois exemplos (Figura 14) para dar uma ideia representativa dos picos resultantes.

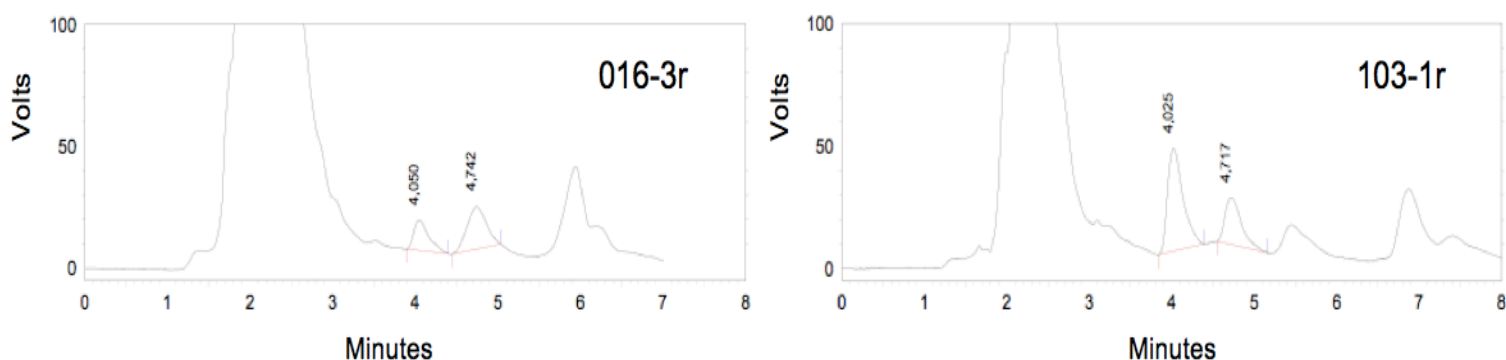


Figura 14 - Exemplo de cromatogramas de amostras: 3ª repetição da amostra 16 (esquerda) e 1ª repetição da amostra 103 (direita).

4.2. Influência da época de colheita e da cultivar

Houve uma grande variabilidade nos valores da pungência e nos teores de capsaicinoides entre amostras da mesma cultivar e da mesma época de colheita (resultados apresentados no Anexo 1). No entanto, para se ter uma primeira ideia mais geral das diferenças entre as datas de colheita e as cultivares apresenta-se no Quadro 4 as médias do valor da pungência, dos teores de capsaicinoides para cada factor e os respetivos desvios padrão.

Quadro 4 - Variação dos teores de capsaicinoides e da pungência ao longo da época de colheita e entre cultivares (n = número de amostras).

Colheita	CAP (mg/kg dw)			DH (mg/kg dw)			Pungência (SHU)		
	Média	n	Desv Padrão	Média	n	Desv Padrão	Média	n	Desv Padrão
05-Jul	108,304	8	117,634	32,834	8	28,614	2225,374	8	2297,242
23-Jul	252,277	8	266,976	190,449	8	175,252	6893,162	8	6479,052
06-Aug	381,331	8	331,018	308,119	8	208,224	10723,090	8	5406,862
22-Aug	264,602	8	243,111	937,851	8	216,179	18301,393	8	3856,549
05-Sep	280,134	8	293,168	205,500	8	115,668	7564,650	8	5753,399
Cultivar	CAP (mg/kg dw)			DH (mg/kg dw)			Pungência (SHU)		
	Média	n	Desv Padrão	Média	n	Desv Padrão	Média	n	Desv Padrão
P1	119,198	10	122,016	385,568	10	390,997	7690,687	10	6843,186
P2	564,345	10	291,614	325,806	10	276,326	13916,611	10	6471,482
Pd	261,734	10	171,762	317,874	10	430,693	8955,855	10	7635,922
Pp	84,042	10	97,125	310,554	10	353,094	6002,983	10	7294,606

Ao comparar-se os valores médios da pungência, verifica-se que ambos os factores apresentaram variações consideráveis: entre datas de colheita chegam-se a verificar aumentos de 722,3 % entre 5 de Julho e 22 de Agosto e entre cultivares verificam-se aumentos até 131,8 % entre P_p e P₂ (os gráficos das Figuras 15 e 16 evidenciam essas diferenças). Entre repetições apenas se encontra uma variação de 5,0 %.

A grande variabilidade nos valores da pungência é demonstrada aqui pelos desvios padrão elevados. Contudo, através dos valores do mesmo indicador, pode verificar-se que entre datas de colheita e entre cultivares, são os resultados de 22 de Agosto e da cultivar P₂ que apresentaram menos aleatoriedade.

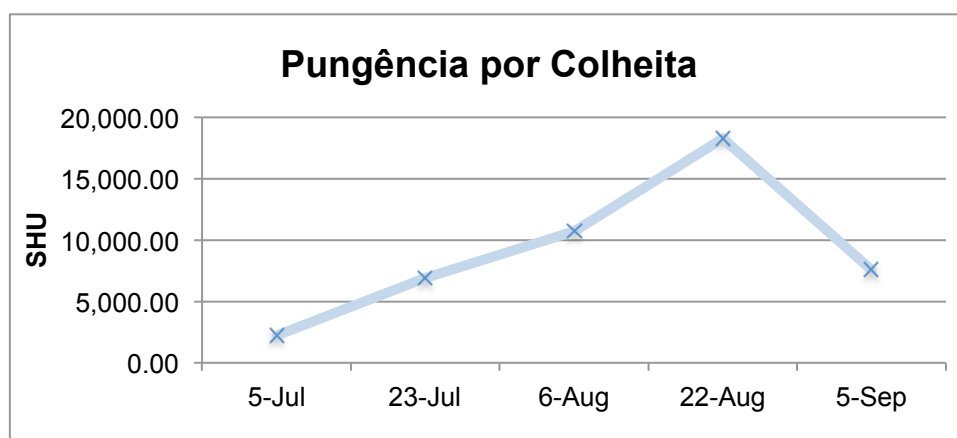


Figura 15 - Gráfico do valor médio da pungência por data de colheita (n=8).

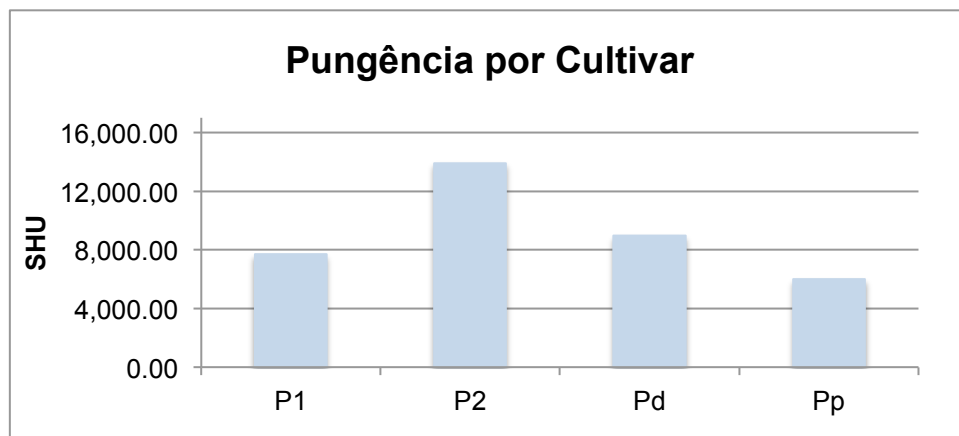


Figura 16 - Gráfico do valor médio da pungência por cultivar (n=10).

Para os valores médios dos teores de capsaicinoides encontram-se variações de algum interesse entre repetições: um aumento de 13,1 % no teor de capsaicina entre o ar livre e a estufa e um aumento de 20,9 % entre a estufa e o ar livre. Contudo, e em sintonia com as variações dos valores médios da pungência, as variações mais marcadas são encontradas nos outros factores. Para a data de colheita: encontram-se aumentos de 252,1 % entre 5 de Julho e 6 de Agosto para a capsaicina e aumentos de 2 756,4 % entre 5 de Julho e 22 de Agosto para a dihidrocapsaicina. Para as cultivares: verificam-se aumentos de 571,5 % entre P_p e P_2 para a capsaicina e apenas aumentos de 24,2 % entre P_p e P_1 para a dihidrocapsaicina. (Os gráficos das Figuras 17 e 18 evidenciam essas diferenças).

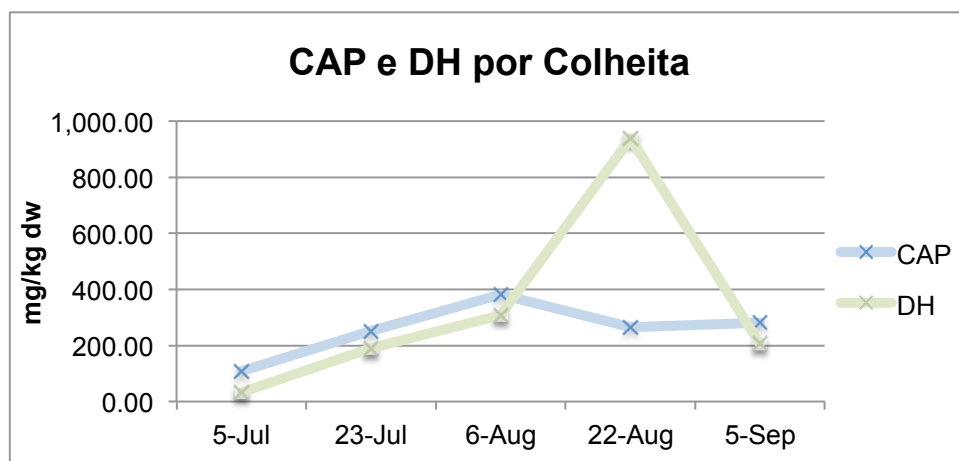


Figura 17 - Gráfico do valor médio dos teores de capsaicinoides por data de colheita (n=8).

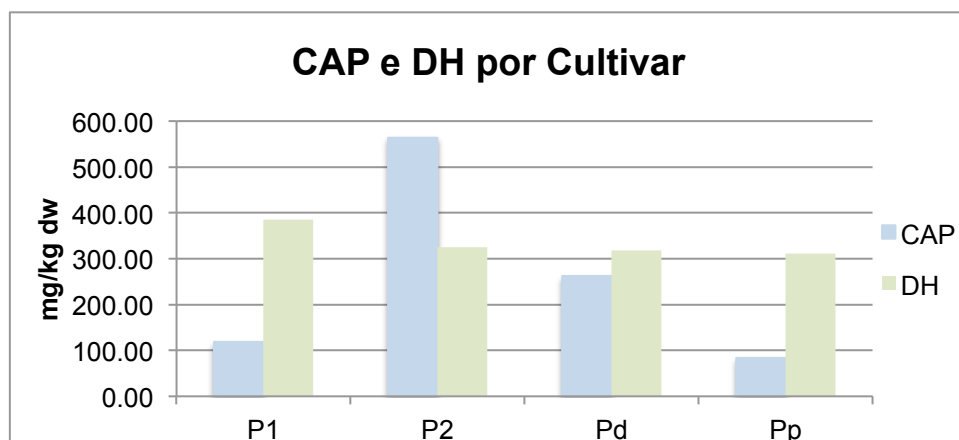


Figura 18 - Gráfico do valor médio dos teores de capsaicínides por cultivar (n=10).

Ao verificar-se a imensa variabilidade entre os valores das amostras, as médias de cada factor não são suficientes para se entender o seu efeito na pungência e no teor de capsaicínides.

As análises de variância deste estudo estão apresentadas no Anexo 1. Os testes de Fisher e os *p-values* dessas ANOVA's estão resumidos de seguida no Quadro 5.

Quadro 5 - Tabela resumo dos testes de Fisher e *p-value* das ANOVA's. Todos os valores de F superior aos valores de F tabelados (F=3,182 quando df=3; F=2,776 quando df=4; F=2,179 quando df=12) e de *p-value* inferior a 0,05 foram sombreados a verde.

	Colheita			Cultivar			Colheita*Cultivar		
	df	F	p	df	F	p	df	F	p
SHU	4	14,72	0,0000	3	6,02	0,0046	12	0,67	0,7577
CAP	4	2,14	0,1156	3	13,38	0,0001	12	0,60	0,8191
DH	4	35,87	0,0000	3	0,43	0,7350	12	1,05	0,4457

Nestas ANOVA's, a hipótese nula é a inexistência de influência de cada factor na pungência ou no teor de cada capsaicinoide das amostras. O nível de significância assumido é 5 % ($\alpha=0,05$), nível usado normalmente em trabalhos similares. Quando o valor de F é superior ao valor tabelado para os graus de liberdade (df) ou quando o *p-value*, probabilidade de significância, é inferior ao nível de significância rejeitamos a hipótese nula, ou seja, existe influência desse factor.

O factor cultivar tem influência no teor de capsaicina e nos valores totais da pungência, no entanto, nunca apresenta significância nos teores de dihidrocapsaicina. Por outro lado, a data de colheita apresenta-se significativamente influente no teor de dihidrocapsaicina e nos valores

totais da pungência, contudo não tem influência no teor de capsaicina. Também deve ser referido que a interação da data de colheita e da cultivar nunca se demonstra significativa, logo assume-se que os factores influenciam a pungência independentemente um do outro (Quadro 5).

A variação do teor de capsaicinoides ao longo do tempo é principalmente justificada pela elevada influência da temperatura na atividade da enzima fenilalanina amónia-liase que desencadeia a via dos fenilpropanoides responsável pela síntese de capsaicinoides (Martínez-Telléz e Lafuente, 1997).

Ao comparar-se a evolução das médias da temperatura dos vinte e um dias antes de cada colheita (dados recolhidos com os monitorizadores instalados no ensaio de campo) com a evolução das concentrações dos capsaicinoides em cada colheita (Figura 19), verifica-se que a dihidrocapsaicina é o capsaicinoide que acompanha a variação da temperatura acumulada. Facto já verificado pelas ANOVA's da concentração desse capsaicinoide, pois é a dihidrocapsaicina que apresenta maior resposta à época de colheita, e às condições climáticas.

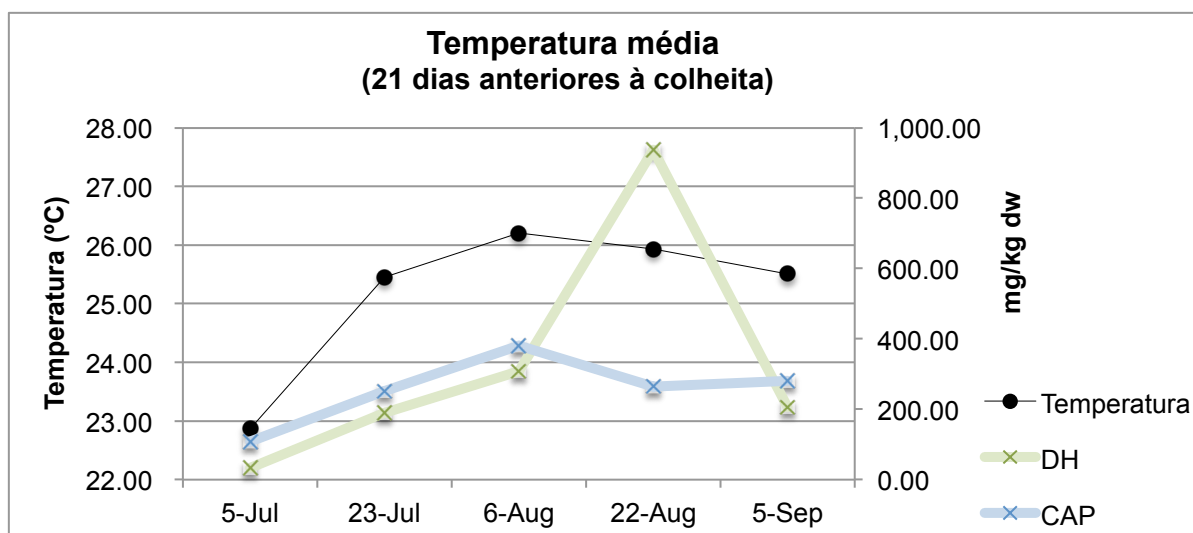


Figura 19 - Variação da temperatura ao longo do tempo. Temperaturas médias diárias dos 21 dias antes de cada colheita e concentrações de CAP e DH.

Estudou-se também a evolução das médias das temperaturas diurnas (10h-18h) e noturnas (22h-6h) dos vinte e um dias antes de cada colheita (dados recolhidos com os monitorizadores

(Figura 20) de modo a entender se existe alguma relação com a acumulação de capsaicinoides.

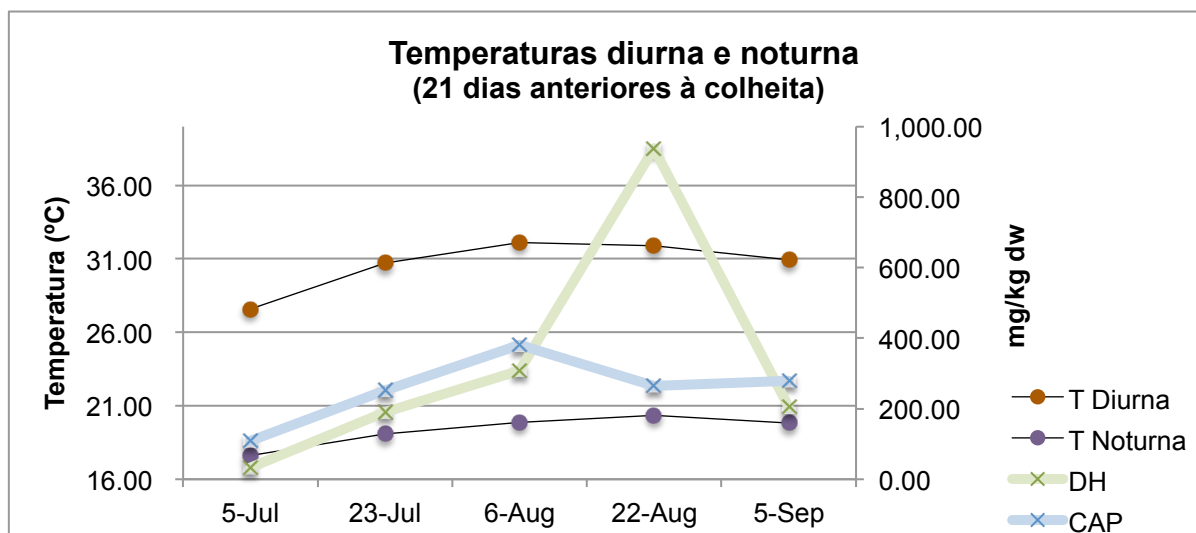


Figura 20 - Variação das temperaturas diurna e noturna ao longo do tempo. Temperaturas médias diurnas e noturnas dos 21 dias antes de cada colheita e concentrações de CAP e DH.

Em ambos os gráficos da evolução da temperatura, a concentração de capsaicina apresenta uma queda acentuada na colheita do dia 22 de Agosto, o que se deve a outros factores externos, como por exemplo a radiação. Está apresentado no gráfico a radiação média dos vinte e um dias antes de cada colheita (dados da radiação solar do IPMA, 2016) e as concentrações dos capsaicinoides em cada uma dessas colheitas (Figura 21), onde se pode pressupor que esta possa ser uma das razões para a descida da concentração de capsaicina na quarta colheita, contudo a falta de dados não permite tirar conclusões com confiança suficiente. Por outro lado, Lee *et al.* (2004) e Rico *et al.* (2010), em estudos da influência de diferentes tipos de radiação na pungência de pimentos, mostraram que esta nunca se apresenta como um factor significativo, logo aconselha-se estudos futuros da radiação para se tirar conclusões melhor fundamentadas.

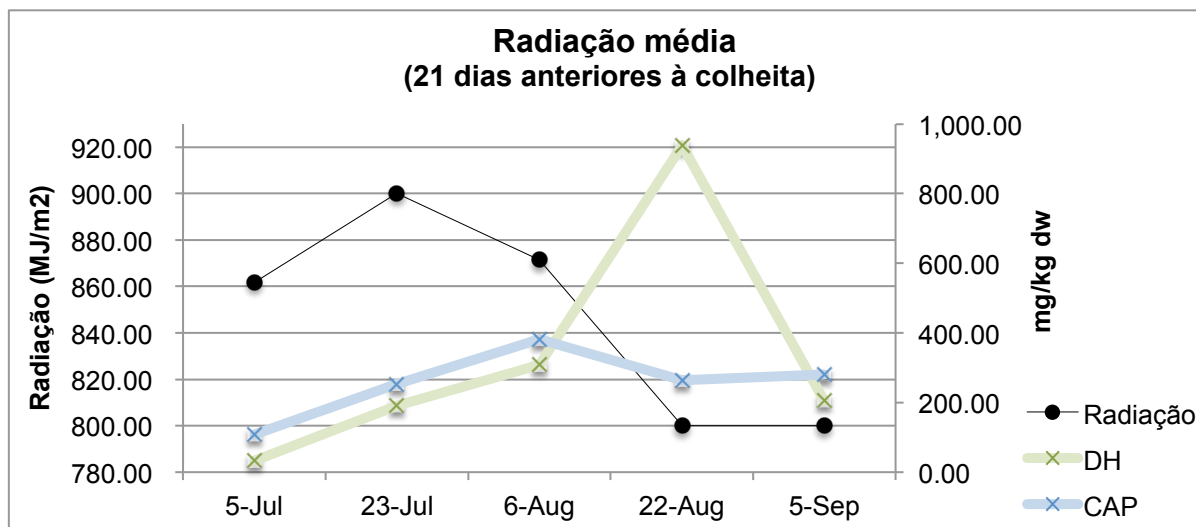


Figura 21 - Variação da radiação solar ao longo do tempo. Radiação média dos 21 dias antes de cada colheita e concentrações de CAP e DH.

4.3. Correlação entre o tamanho do fruto e a pungência

Devido à elevada quantidade de resultados desta parte do trabalho, estes estão apresentados no Anexo 2.

Entre as amostras da primeira cultivar, verificam-se variações de 11 923,3 % para os valores da pungência, de 22 686,1 % para os teores de capsaicina e de 18 133,2 % para os teores de dihidrocapsaicina. Mais uma vez, como nos resultados do ponto 4.2, verificam-se grandes diferenças entre os resultados.

Na análise estatística desta parte do trabalho, estudou-se, em primeiro lugar, a correlação entre o tamanho (massa da amostra) e os valores da pungência (Figura 22) e teores de capsaicinoides (Figura 23).

Ao comparar-se estes gráficos com os resultados apresentados no ponto 4.2, nota-se que há coerência entre os valores dos dois estudos. Tanto os valores da pungência como os teores de capsaicinoides apresentam muita variabilidade mas situam-se sensivelmente nos mesmos intervalos de valores; excetuando os teores de dihidrocapsaicina que nestas amostras demonstram ser significativamente inferiores, muito provavelmente devido à data de colheita deste estudo ter sido um dos dias que apresentou menor teores deste capsaicinoide e as médias usadas no ponto 4.2 terem sido feitas para todas as colheitas como um conjunto.

Nos testes de correlação de Pearson obtiveram-se valores muito próximos de zero (Figuras 22 e 23), o que permite assumir que também não se verifica correlação entre a massa e as outras variáveis.

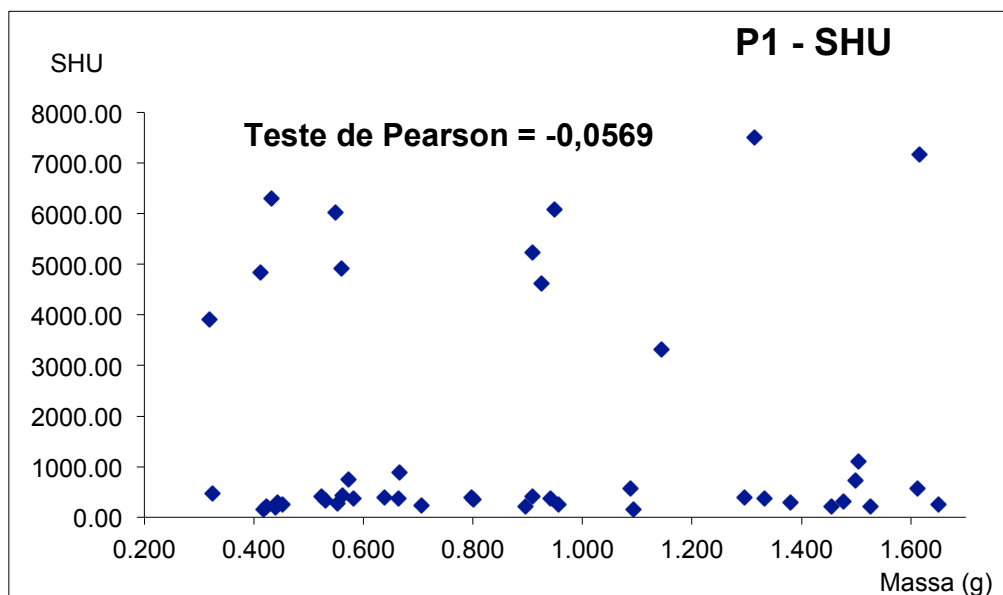


Figura 22 - Correlação entre os valores da pungência e massa das amostras da cultivar P₁.

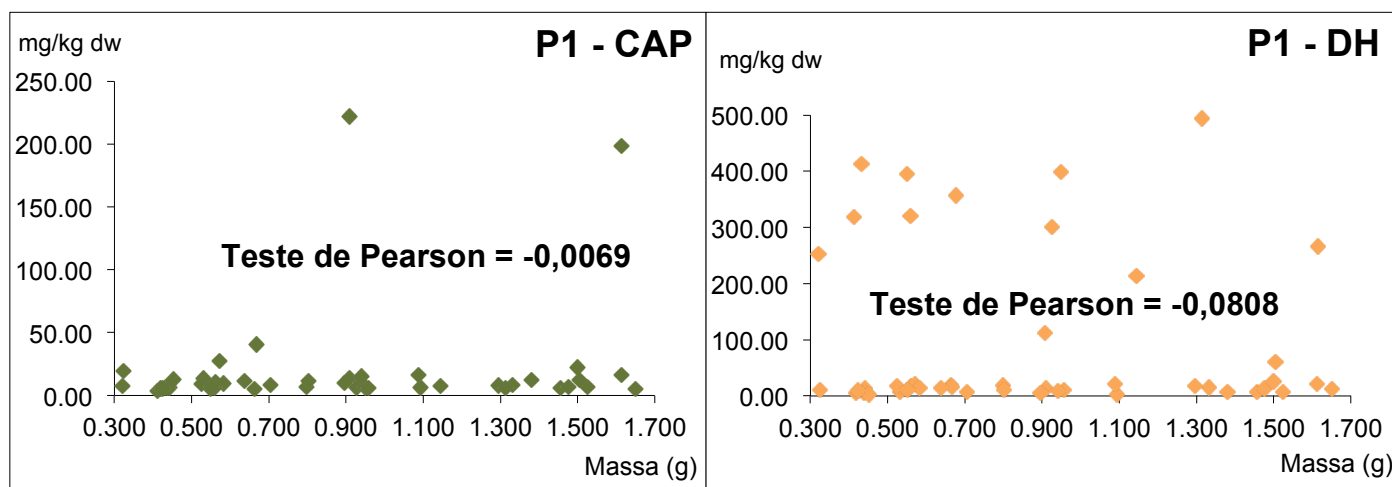


Figura 23 - Correlação entre os teores de capsaicinoides e massa das amostras da cultivar P₁.

Surge a necessidade de um estudo mais aprofundado da relação entre a massa das amostras e as outras variáveis; realizaram-se então análises de variância para a pungência e teores dos capsaicinoides separadamente, cujos factores em estudo são a massa das amostras e a planta donde cada amostra é originária.

Tal como no estudo anterior, criou-se uma tabela resumo (Quadro 6) com os testes de Fisher e os *p-value* de cada ANOVA para se entender com maior facilidade qual dos factores se relaciona realmente com a pungência e com os teores de capsaicinoides (as ANOVA's completas estão no Anexo 2). Novamente, a hipótese nula foi a inexistência de relação de cada factor com os níveis de pungência e o nível de significância foi de 5 %, sendo então que para factores com valores de F superior ao valor tabelado para os graus de liberdade ou p-values inferiores a 0,05, rejeita-se a hipótese nula e assume-se que há relação entre o factor e a pungência ou teor de capsaicinoides. Sombreado-se a verde, os valores significativos.

Quadro 6 - Tabela resumo dos *p-value* das ANOVA's da cultivar P1. Todos os valores de F superior aos valores de F tabelados (F=12,706 quando df=1; F=2,074 quando df=22) e de *p-value* inferior a 0,05 foram sombreados a verde.

	Massa			Planta		
	df	F	p	df	F	p
SHU	1	1,61	0,2181	22	4,44	0,0005
CAP	1	1,55	0,2259	22	2,55	0,0166
DH	1	0,42	0,5215	22	6,87	0,0000

A massa nunca apresenta correlação com a pungência nem com as concentrações de capsaicinoides como foi demonstrado pelos testes de correlação, e não apresenta também significância nestas ANOVA's. Por outro lado, verifica-se que a pungência e os teores de capsaicinoides dependem da planta donde cada amostra é proveniente, isto justifica-se acima de tudo por factores internos a cada planta, como o seu genoma e metabolismo.

Na segunda cultivar, as variações apresentadas entre os resultados é de 17 280,8 % para os valores da pungência, de 34 107,7 % para os teores de capsaicina e de 9 723,3 % para teores de dihidrocapsaicina.

Tal como para a primeira cultivar, a análise estatística baseou-se num teste de correlação de Pearson entre a massa das amostras e os valores da pungência (Figura 24) e teores de capsaicinoides (Figura 25).

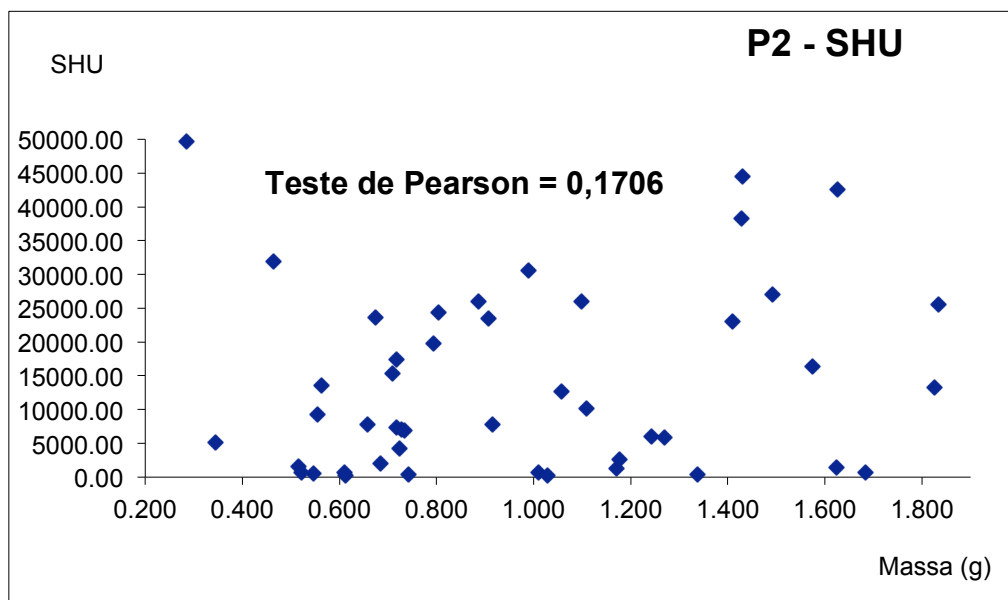


Figura 24 - Relação linear para os valores da pungência e massa das amostras da cultivar P₂.

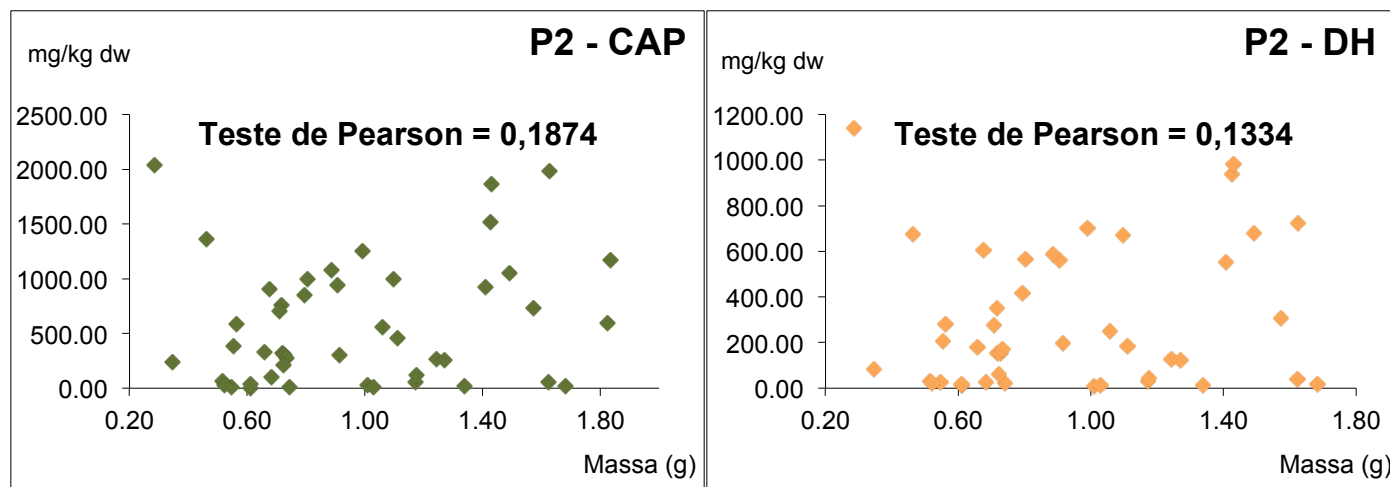


Figura 25 - Relação linear para os teores de capsaicinoides e massa das amostras da cultivar P₂.

Tal como para a cultivar P₁, encontram-se semelhanças entre os resultados desta cultivar no ponto 4.2 e o que é apresentado nestes gráficos. Os intervalos de valores em que se situam estes resultados, correspondem sensivelmente aos do outro estudo. Ainda se verifica claramente que, uma vez mais, esta cultivar se apresenta com valores de pungência e teores de capsaicina bastante superiores ao da cultivar P₁.

Nos gráficos da correlação para a cultivar P₂ (Figuras 24 e 25), a dispersão acentuada dos pontos e os testes de Pearson próximos de zero comprovam que também não se verifica a existência de correlação entre as duas variáveis.

Os valores de F e os *p-value* das análises de variância da segunda cultivar para a pungência e teores dos capsaicinóides com os factores: massa das amostras e planta donde cada amostra é originária, estão presentes no Anexo 2 e resumidos no Quadro 7. Para se rejeitar a hipótese nula, o valor de F tem de ser superior ao valor tabelado para os graus de liberdade e o *p-value* inferior a 0,05. Na tabela resumo, os valores de interesse estão sombreados a verde.

Os valores obtidos apresentam-se muito semelhantes ao da outra cultivar. A massa nunca apresenta relação à pungência e ao teor de capsaicinóides, e é a planta que se demonstra influente em todos os casos.

Quadro 7 - Tabela resumo dos *p-value* das ANOVA's da cultivar P₂. Todos os valores de F superior aos valores de F tabelados (F=12,706 quando df=1; F=2,074 quando df=22) e de *p-value* inferior a 0,05 foram sombreados a verde.

	Massa			Planta		
	df	F	p	df	F	p
SHU	1	0,93	0,3444	22	5,49	0,0001
CAP	1	1,17	0,2919	22	5,55	0,0001
DH	1	0,48	0,4936	22	4,87	0,0002

Todos os resultados deste ponto 4.3, demonstram que é o genótipo que tem influência na pungência dos frutos. Como são cultivares de polinização livre, ambas as cultivares apresentam uma grande variabilidade interna e para se entender o efeito deste factor interno é necessário realizar-se futuros estudos direccionados para o genoma das plantas.

5. Conclusões

Os resultados finais deste trabalho vão de encontro aos resultados de muitos trabalhos similares (Sakamoto *et al.*, 1994; Estrada *et al.*, 1997, 1998, 1999; Karnka *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2005; Santos, 2009). Tanto a pungência como os teores de capsaicinoides dos frutos de pimentos Padrón é claramente influenciada por factores internos (estudados por meios comparativos entre cultivares da variedade em estudo) e por factores externos às plantas, mais concretamente as diferentes condições climáticas entre datas de colheita.

No estudo da influência da data de colheita na pungência, através das médias diárias, diurnas e noturnas dos vinte e um dias antes de cada data de colheita, verificou-se que tanto a temperatura diurna como noturna acompanharam a variação da pungência e dos teores de dihidrocapsaicina ao longo do tempo. A temperatura acumulada também apresentou uma evolução que acompanhou os valores de pungência e os teores de dihidrocapsaicina. O teor de capsaicina apresentou uma queda na colheita de 22 de Agosto, o que se acredita que possa ser devido à queda da radiação que é o único factor externo não controlado que apresenta valores baixos nos dias antes dessa data.

Devido aos aumentos de temperatura entre datas de colheita, registaram-se aumentos de 722,3 % para os valores da pungência, 252,1 % para os teores de capsaicina e 2 756,4 % para os de dihidrocapsaicina. Também as análises de variância demonstram que a data de colheita é o factor com maior significância na influência na pungência e teor de dihidrocapsaicina. Nos teores de capsaicina, este factor não se apresenta como o mais significativo devido à grande queda dos valores na segunda colheita mais quente, o que se torna incongruente com os restantes resultados.

No estudo da influência da cultivar, todas as cultivares apresentam grande variabilidade nos teores de capsaicinoides e na pungência total. Facto que vai contra as considerações iniciais em que apenas duas das cultivares se apresentariam assim devido a terem polinização livre. É de se evidenciar, pois tanto o maior como o menor valor de pungência são de amostras do mesmo híbrido (P_d). Sendo assim, os novos híbridos F1 mantêm as características pungentes das cultivares tradicionais.

Para os valores médios obtidos por cultivar no valor da pungência e no teor de capsaicina, a ordem do maior para o menor das variedades é: $P_2 > P_d > P_1 > P_p$. Para o teor de dihidrocapsaicina a ordem decrescente é: $P_d > P_1 > P_p > P_2$.

Encontram-se também grandes variações nos valores médios entre variedades: aumentos de 132,8 % para os valores da pungência, 571,5 % para os teores de capsaicina e 24,2 % para os de dihidrocapsaicina. Nas análises de variância, este factor apresenta-se sempre como significativo para a pungência total e para a capsaicina, no entanto não tem influência na dihidrocapsaicina.

Na segunda parte deste trabalho, demonstra-se que nunca existe correlação entre o tamanho dos frutos e a sua pungência ou teor de capsaicinoides nas duas variedades estudadas. O tamanho dos frutos foi representado através da sua massa e realizou-se uma análise estatística completa (testes de correlação e análises de variância) para comprovar estas conclusões.

Ao estudar-se a influência da planta, donde cada amostra é proveniente, na pungência ou teor de capsaicinoides, verifica-se que esta se demonstra sempre significativa nestes valores, o que permite concluir que é o genótipo que influencia a composição dos frutos e não o seu tamanho. Ou seja, frutos da mesma planta hão-de apresentar sempre valores de pungência semelhantes.

A falta de informação na bibliografia sobre a variedade Padrón, confirma que existe a necessidade de mais investigação da composição das plantas e dos seus frutos. Aconselha-se principalmente a realização de estudos de genética como a sequenciação do genoma (para se obter a sequência total do genoma) e a anotação do genoma, para se entender os genes que o compõem e que codificam as enzimas responsáveis pela síntese dos compostos presentes na via dos fenilpropanoides e na via dos ácidos 8-metilnonanóico e 8-metil-6-nonanóico, que contribuem para a síntese dos capsaicinoides.

Conclui-se então que a famosa aleatoriedade da pungência dos pimentos Padrón não depende do tamanho do fruto mas sim da planta donde o fruto é colhido. No entanto, depois da colheita, os frutos são todos misturados e não se obtém embalagens representativas de cada planta, sendo por isso que ainda se verifica essa aleatoriedade e que a frase popular espanhola “*Los pimientos de Padrón, unos pican y otros no*” ainda hoje é comumente utilizada.

Referências bibliográficas

- Almeida D, 2006. *Manual de Culturas Hortícolas - Volume II*. Barcarena, Portugal: Editorial Presença.
- Alves M, 2015. *Comparativo entre quantidade e capacidade antioxidante de pimentas orgânicas e não-orgânicas*. Assis, Brasil: Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, Trabalho de Conclusão de Curso.
- Consejo Regulador de la DOP “Pemento de Herbón”, 2010. Pemento de Herbón. [<http://www.pementodeherbon.com/index2.htm>] Acedido a 26 de Maio de 2017.
- Contreras-Padilla M, Yahia EM, 1998. Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity. *J. Agricultural and Biological Chemistry* **46** (6), 2075-2079.
- Díaz J, Pomar F, Bernal Á, Merino F, 2004. Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L. *Phytochemistry Reviews* **3**, 141–157.
- Estrada B, Pomar F, Díaz J, Merino F, Bernal MA, 1997. Evolution of capsaicinoids in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* cv. Padrón fruit at different growth stages. *Capsicum Eggplant Newsletter* **16**, 60-63.
- Estrada B, Pomar F, Díaz J, Merino F, Bernal MA, 1998. Effects of mineral fertilizer supplementation on fruit development and pungency in ‘Padrón’ peppers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **73** (4), 493-497.
- Estrada B, Pomar F, Díaz J, Merino F, Bernal MA, 1999. Pungency level in fruits of the Padrón pepper with different water supply. *Scientia Horticulturae* **81**, 385-396.
- FatSecret España, 2017. Pimientos de Padrón In: Alimentos. [<https://www.fatsecret.es/calor%C3%ADas-nutrici3n/gen3rico/pimientos-de-padr3n?portionid=59210&portionamount=100,000>] Acedido a 5 de Janeiro de 2018.
- García-Galindo, Ortega-Martínez HJ, García-Rosales M, Martínez C, Beristáin C, 1995. La capsaicina, el principio pungente del chile; su naturaleza, absorción, metabolismo y efectos farmacológicos. *Ciência* **46**, 84-102.

- Gonçalves P, 2009. *Síntese de análogos de capsaicina e nova síntese da dihidrocapsaicina como potenciais substâncias antibacterianas*. Campos dos Goytacazes, Brasil: Universidade Estadual do Norte Fluminense, Dissertação de Mestrado.
- Govindarajan VS, Rajalakshmi D, Chand N, 1987. Capsicum production, technology, chemistry, and quality. Part IV. Evaluation of quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **25** (3), 185-282.
- IPMA, 2016. Boletins agrícolas In: Agrometeorologia. [<http://www.ipma.pt/pt/publicacoes/boletins.jsp?cmbDep=agr&cmbTema=bag&cmbAno=2016&idDep=agr&idTema=bag&curAno=2016>]. Acedido a 26 de Maio de 2017.
- Iwai K, Suzuki T, Fujiwake H, 1979. Formation and Accumulation of Pungent Principle of Hot Pepper Fruits, Capsaicin and Its Analogues, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa at Different Growth Stages after Flowering. *J. Agricultural and Biological Chemistry* **48** (12), 2493-2498.
- Karnka R, Rayanakorn M, Watanesk S, Vaneesorn Y, 2002. Optimization of high-performance liquid chromatographic parameters for the determination of capsaicinoid compounds using the simplex method. *Analytical Sciences* **18** (6), 661-665.
- Lee JH, Sung TH, Lee KT, Kim MR, 2004. Effect of gamma-irradiation on color, pungency and volatiles of Korean Red Pepper Powder. *Journal of Food Science* **69** (8), 585–592.
- Leira MR, Rodriguez Bao JM, Terrén Povés L, 2006. *Producción del Pimiento de Padron en Galicia*. Pontevedra, Espanha: Centro de Formación y Experimentación Agraria.
- Maillard M, Giampaoli P, Hubert MJR, 1997. Analysis of eleven capsaicinoids by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Flavour Fragrance J.* **12** (6), 409-413.
- Malviya R, Bansal V, Pal OP, Sharma PK, 2010. High performance liquid chromatography: a short review. *Journal of Global Pharma Technology* **2** (5), 22-26.
- Martínez-Téllez MA, Lafuente MT, 1997. Effect of high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase activities in flavedo of chilled «Fortune» mandarin fruit. *Journal of Plant Physiology* **150** (6), 674-678.
- Mortensen JM, Mortensen JE, 2009. The power of Capsaicin. *Journal of Continuing Education Topics & Issues* **11** (1), 8-12.

- Narasimha Prasad BC, Kumar V, Gururaj HB, Parimalan R, Giridhar P, Ravishankar GA, 2006. Characterization of capsaicin synthase and identification of its gene (csy1) for pungency factor capsaicin in pepper (*Capsicum* spp.). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103** (36), 13315–13320.
- Nuez F, Gil Ortega R, Costa J, 1996. *El Cultivo de Pimientos, Chiles y Ajies*. Madrid, Espanha: Mundi-Prensa Libros.
- Othman Z, Ahmed Y, Habila M, Ghafar A, 2011. Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in *Capsicum* Fruit Samples using High Performance Liquid Chromatography. *Molecules* **16**, 8919-8929.
- Pita da Veiga MAB, 1993. *Estudio del polimorfismo isoenzimático en el pimiento de Padrón, Capsicum annuum L. var. annuum, a lo largo del desarrollo*. La Coruña, Espanha: Universidad de la Coruña, Tese de Doutoramento.
- Rico CW, Kim GR, Ahn JJ, Kim HK, Furuta M, Kwon JH, 2010. The comparative effect of steaming and irradiation on the physicochemical and microbiological properties of dried red pepper (*Capsicum annum* L.). *Food Chemistry* **119** (3), 1012–1016.
- Rodríguez Bao JM, Terrén Povés L, Rivera Martínez A, Andrés Ares JL, Fernández Paz J, 2004. Pimientos autóctonos de Galicia. *Horticultura Internacional* **43**, 34-40.
- Sakamoto S, Goda Y, Maitani T, Yamada T, Nunomura O, Ishikawa K, 1994. High- performance liquid chromatographic analyses of capsaicinoids and their phenolic intermediates in *Capsicum annuum* to characterize their biosynthetic status. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 1141-1142.
- Sánchez EC, Vallejo PR, González FR, Hernández RMS, González MTR, Servia JLC, 2005. Capsaicinoides y preferencia de uso en diferentes morfotipos de Chile (*Capsicum annuum* L.) del centro-oriente de Yucatán. *Agrociencia* **39** (6), 627-638.
- Santos V, 2009. *Caracterização Morfológica e Determinação da Pungência em Pimentos Picantes*. Lisboa, Portugal: Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia, Dissertação de Mestrado.
- SAT Canarisol, 2013. Pimiento Semipicante. In: Productos. [<http://www.satcanarisol.es/pimiento-padron>]. Acedido a 26 de Maio de 2017.

- Scoville W, 1912. Note on capsicums. *Journal of the American Pharmaceutical Association* **1**, 453–454.
- Sequeiro N, 2006. Marruecos cultiva más pimientos de ‘Padrón’ que la tierra de Rosalía. In: El Correo Gallego. [<http://www.elcorreogallego.es/galicia/economia/ecg/marruecos-cultiva-pimientos-padron-tierra-rosalia/idEdicion-2006-05-14/idNoticia-44645/>]. Acedido a 17 de Maio de 2017.
- Tewksbury JJ, Manchego C, Haak DC, Levey DJ, 2006. Where did the chili get its spice? Biogeography of capsaicinoid production in ancestral wild chili species. *Journal of Chemical Ecology* **32** (3), 547-564.
- Todd Jr. PH, Bensinger MG, Biftu T, 1977. Determination of pungency due to Capsicum by gas–liquid chromatography. *Journal of Food Science* **42**, 660-665.
- Topuz A, Ozdemir F, 2007. Assessment of carotenoids, capsaicinoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis* **20**, 596–602

Anexo 1 - Influência da época de colheita e da cultivar

Quadro 8 - Médias das três injeções da análise por HPLC das amostras do primeiro estudo.

Colheita	Repetição	Cultivar	CAP (mg/kg dw)	DH (mg/kg dw)	Pungência (SHU)
05-Jul	1	P1	5,928	16,481	342,061
05-Jul	2	P1	67,122	17,789	1340,777
05-Jul	1	P2	206,937	58,500	4188,488
05-Jul	2	P2	263,021	56,677	5058,488
05-Jul	1	Pd	268,590	80,428	5503,872
05-Jul	2	Pd	3,338	3,975	113,032
05-Jul	1	Pp	7,281	3,607	170,605
05-Jul	2	Pp	44,217	25,213	1085,673
23-Jul	1	P1	30,392	267,883	4504,518
23-Jul	2	P1	190,276	75,718	4180,197
23-Jul	1	P2	822,352	573,625	21762,004
23-Jul	2	P2	383,577	169,068	8673,248
23-Jul	1	Pd	312,423	118,716	6779,505
23-Jul	2	Pd	216,861	101,656	4994,614
23-Jul	1	Pp	53,318	213,532	4056,058
23-Jul	2	Pp	9,017	3,392	195,157
06-Aug	1	P1	331,158	447,675	12013,655
06-Aug	2	P1	143,872	489,785	9648,735
06-Aug	1	P2	895,998	195,302	17265,496
06-Aug	2	P2	876,581	236,152	17567,573
06-Aug	1	Pd	375,094	22,289	6335,835
06-Aug	2	Pd	192,185	300,773	7586,541

Anexos

06-Aug	1	Pp	225,880	650,191	13366,948
06-Aug	2	Pp	9,883	122,788	1999,939
22-Aug	1	P1	8,413	923,553	13987,896
22-Aug	2	P1	303,035	1173,692	22453,951
22-Aug	1	P2	177,807	899,225	16333,282
22-Aug	2	P2	795,668	586,383	21526,421
22-Aug	1	Pd	310,048	1265,208	23938,891
22-Aug	2	Pd	275,076	918,306	18175,803
22-Aug	1	Pp	36,822	988,732	15420,130
22-Aug	2	Pp	209,945	747,710	14574,774
05-Sep	1	P1	1,628	309,525	4668,931
05-Sep	2	P1	110,155	133,577	3766,146
05-Sep	1	P2	482,587	138,195	9794,312
05-Sep	2	P2	738,922	344,936	16996,802
05-Sep	1	Pd	45,432	31,203	1194,953
05-Sep	2	Pd	618,295	336,186	14935,505
05-Sep	1	Pp	232,174	128,331	5639,743
05-Sep	2	Pp	11,880	222,049	3520,807

ANOVA dos valores da pungência:

Analysis of Variance Table for SHU

Source	DF	SS	MS	F	P
colheita	4	1.134E+09	2.836E+08	14.72	0.0000
cultivar	3	3.479E+08	1.159E+08	6.02	0.0046
colheita*cultivar	12	1.552E+08	1.293E+07	0.67	0.7577
Error	19	3.661E+08	1.927E+07		
Total	39	2.005E+09			
Grand Mean	9141.0	CV 48.02			

ANOVA dos teores de capsaicinoides:

Analysis of Variance Table for CAP

Source	DF	SS	MS	F	P
colheita	4	305468	76367	2.14	0.1156
cultivar	3	1433869	477956	13.38	0.0001
colheita*cultivar	12	255646	21304	0.60	0.8191
Error	19	678640	35718		
Total	39	2683630			
Grand Mean	257.33	CV	73.44		

Analysis of Variance Table for DH

Source	DF	SS	MS	F	P
cultivar	3	35325	11775	0.43	0.7350
colheita	4	3944974	986243	35.87	0.0000
cultivar*colheita	12	347247	28937	1.05	0.4457
Error	19	522347	27492		
Total	39	4889985			
Grand Mean	334.95	CV	49.50		

Anexo 2 - Correlação entre o tamanho do fruto e a pungência

Quadro 9 - Médias das três injeções da análise por HPLC das amostras do segundo estudo.

Planta	Fruto	Amostra	Massa (g)	CAP (mg / kg dw)	DH (mg / kg dw)	Pungência (SHU)
1	P	1	0,320	7,262	252,453	3902,984
2	P	2	0,926	6,343	301,146	4618,686
3	P	3	0,412	3,531	318,805	4838,579
4	P	4	0,950	6,260	398,690	6080,515
5	P	5	0,550	5,663	395,217	6018,858
6	P	6	1,381	12,056	6,937	296,954
7	P	7	0,706	8,264	6,962	236,644
8	P	8	1,650	4,686	12,426	261,366
9	P	9	0,664	4,838	19,323	367,254
10	P	10	1,333	8,364	14,851	356,587
11	P	11	0,324	19,528	10,301	466,961
12	P	12	1,525	6,857	7,554	223,019
13	P	13	0,562	10,501	17,875	436,153
14	P	14	0,798	6,921	18,671	390,803
15	P	15	0,678	804,346	356,955	18223,853
16	P	16	1,505	12,027	60,478	1099,600
17	P	17	0,572	27,480	21,072	755,756
18	P	18	1,296	7,789	18,157	396,977
19	P	19	0,442	6,419	12,822	295,036
20	P	20	0,909	13,855	13,103	418,234
21	P	21	0,583	9,628	14,394	369,956
22	P	22	1,612	16,142	21,081	574,490

Anexos

23	P	23	0,667	40,490	16,654	897,646
1	G	24	1,314	6,093	494,109	7509,120
2	G	25	0,560	6,548	321,163	4922,221
3	G	26	1,145	7,442	213,111	3315,734
4	G	27	0,432	6,669	412,763	6298,149
5	G	28	1,093	6,664	2,997	151,571
6	G	29	0,531	13,549	7,498	329,245
7	G	30	1,456	6,079	7,256	206,107
8	G	31	0,439	6,652	4,773	178,031
9	G	32	0,957	5,698	10,300	245,676
10	G	33	0,418	5,621	4,965	164,413
11	G	34	0,908	221,894	111,917	5229,060
12	G	35	0,452	12,716	2,708	244,077
13	G	36	1,477	7,054	12,870	305,919
14	G	37	0,801	11,444	11,267	352,121
15	G	38	1,615	198,216	266,259	7165,347
16	G	39	0,524	9,176	17,474	408,917
17	G	40	1,089	15,912	21,568	578,100
18	G	41	0,552	6,850	10,927	273,509
19	G	42	0,941	14,883	8,457	364,976
20	G	43	0,423	5,618	9,236	228,429
21	G	44	0,896	9,851	4,544	225,773
22	G	45	0,638	11,557	14,107	396,519
23	G	46	1,499	22,260	25,036	731,694
1	P	47	0,515	65,183	29,471	1484,989
2	P	48	1,683	24,446	16,181	633,857
3	P	49	0,345	239,791	83,716	5092,396

Anexos

4	P	50	0,742	11,664	21,011	501,788
5	P	51	0,547	10,880	25,486	556,374
6	P	52	1,172	49,109	30,198	1238,713
7	P	53	0,658	324,663	177,492	7856,995
8	P	54	1,243	258,817	126,882	6044,300
9	P	55	0,717	757,349	352,250	17401,332
10	P	56	1,176	120,291	42,951	2568,922
11	P	57	0,718	320,396	152,478	7413,509
12	P	58	1,009	27,467	11,610	613,623
13	P	59	0,727	302,755	152,417	7130,329
14	P	60	1,058	552,783	252,484	12631,794
15	P	61	0,804	994,556	566,173	24405,488
16	P	62	1,492	1053,148	677,320	27010,178
17	P	63	0,286	2035,363	1140,490	49673,159
18	P	64	0,990	1249,609	704,412	30559,922
19	P	65	0,554	385,873	208,054	9294,778
20	P	66	1,625	1980,154	722,677	42522,623
21	P	67	0,522	26,172	20,703	729,308
22	P	68	1,427	1515,377	939,232	38334,509
23	P	69	0,463	1361,152	676,535	31926,467
1	G	70	0,734	270,316	169,044	6860,717
2	G	71	0,683	100,397	26,186	1999,133
3	G	72	1,110	461,607	183,162	10133,141
4	G	73	0,612	5,595	13,085	285,793
5	G	74	1,029	8,246	12,532	319,902
6	G	75	1,338	13,867	14,510	439,526
7	G	76	1,826	592,506	253,034	13275,606

Anexos

8	G	77	0,709	702,208	275,186	15363,114
9	G	78	0,915	302,030	198,189	7805,310
10	G	79	0,723	206,413	60,691	4212,977
11	G	80	1,573	737,504	307,327	16409,970
12	G	81	0,611	32,515	17,331	780,201
13	G	82	1,270	254,703	121,980	5904,948
14	G	83	0,675	906,011	605,837	23583,741
15	G	84	1,408	922,451	552,722	23050,037
16	G	85	0,906	937,746	562,592	23442,825
17	G	86	1,835	1171,351	451,867	25519,610
18	G	87	0,794	845,650	415,851	19768,160
19	G	88	1,097	990,171	672,698	25933,205
20	G	89	0,562	582,901	282,706	13566,996
21	G	90	1,623	48,557	39,896	1375,344
22	G	91	0,886	1076,702	586,508	26024,843
23	G	92	1,430	1862,467	980,704	44510,030

ANOVA dos valores da pungência da cultivar P₁:

Analysis of Variance Table for SHU

Source	DF	SS	MS	F	P
massa	1	6657679	6657679	1.61	0.2181
planta	22	4.050E+08	1.841E+07	4.44	0.0005
Error	22	9.113E+07	4142383		
Total	45				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 1822.0 CV 111.70

ANOVA dos teores de capsaicinoides da cultivar P₁:**Analysis of Variance Table for CAP**

Source	DF	SS	MS	F	P
massa	1	13484	13483.9	1.55	0.2259
planta	22	486312	22105.1	2.55	0.0166
Error	22	191059	8684.5		
Total	45				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares
Grand Mean 28.880 CV 322.68

Analysis of Variance Table for DH

Source	DF	SS	MS	F	P
massa	1	2319	2318.9	0.42	0.5215
planta	22	825858	37539.0	6.87	0.0000
Error	22	120206	5463.9		
Total	45				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares
Grand Mean 90.664 CV 81.53

ANOVA dos valores da pungência da cultivar P₂:**Analysis of Variance Table for SHU**

Source	DF	SS	MS	F	P
massa	1	5.314E+07	5.314E+07	0.93	0.3444
planta	22	6.867E+09	3.122E+08	5.49	0.0001
Error	22	1.252E+09	5.691E+07		
Total	45				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares
Grand Mean 13989 CV 53.93

ANOVA dos teores de capsaicinoides da cultivar P₂:**Analysis of Variance Table for CAP**

Source	DF	SS	MS	F	P
massa	1	115096	115096	1.17	0.2919
planta	22	1.205E+07	548138	5.55	0.0001
Error	22	2171128	98688		
Total	45				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares
Grand Mean 587.79 CV 53.45

Analysis of Variance Table for DH

Source	DF	SS	MS	F	P
massa	1	15404	15404	0.48	0.4936
planta	22	3406976	154863	4.87	0.0002
Error	22	699134	31779		
Total	45				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares
Grand Mean 305.61 CV 58.33